FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 16

Sur l'intérêt des Méthodes modernes du dosage de la Glycémie

THÈSE

présentée et publiquement soutenue

devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

LE 17 NOVEMBRE 1967

par

NGUYEN HUU QUYNH

PHARMACIEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse : MM. les Professeurs DUMAZERT (Président), GREBUS, BARET, GHIGLIONE (Assesseurs)

IMPRIMERIE LINO-IMP - MARSEILLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0046

NGUYEN HUU QUYNH

Sur l'intérêt des Méthodes modernes du dosage de la Glycémie

Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Marseille

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : H. GASTAUT

Doyen honoraire : G. MORIN

Assesseurs : Ch. GREBUS et J. CHARPIN

Attaché Principal, Chef des Services Administratifs : P. MOUCHET.

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. MONGES, ROCHE, CHAUVIN, MATTEI, DE VERNEJOUL, GIRAUD, MERCIER, MARONNEAUD, VIGNOLI.

PROFESSEURS TITULAIRES DE CHAIRES

Anatomie	MM. GRISOLI
Anatomie appliquée et Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie pathologique	GASTAUT
Bactériologie et virologie	BRAHIC
Biochimie médicale	LISSITZKY
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie Clinique et Expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique et hydrologie	PASTOR
Chimie biologique	DERRIEN
Chimie minérale	MOURGUE
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	LAMY
Clinique Chirurgicale	LENA
Clinique Chirurgicale Infantile et orthopédie	SALMON
Clinique de Chirurgie Thoracique	DOR
Clinique Dermatologique	HADIDA
Clinique d'Endocrinologie	VAGUE
Clinique Exotique	BLANC
Clinique Médicale	N...
Clinique Médicale	AUDIER
Clinique Médicale Thérapeutique et des Maladies du Sang	OLMER
Clinique des Maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique des Maladies des voies disgestives et de la nutrition	MONGES H
Clinique Médicale infantile	BERNARD R.
Clinique de Neurologie	BOUDOURESQUES
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologie	N...
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique Pneumo-Phtisiologique	CHARPIN
Clinique psychiatrique	SUTTER
Clinique Rhumatologique	RECORDIER
Clinique Stomatologique	LACHARD
Clinique Urologique	DUCASSOU

Electroradiologie	MM. LEGRE
Histologie et Embryologie	PICARD
Histologie et Embryologie	STAHL
Hygiène et Médecine sociale	SAUTET
Matière Médicale	N...
Médecine expérimentale	DONNET
Médecine légale et Médecine du travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie Chirurgicale	GRANJON
Pathologie Interne	MOUREN
Pharmacie Chimique et Toxicologie	N...
Pharmacie Galénique	BERNARD P.
Pharmacologie Pharmaceutique	N...
Physiologie	MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires	LAVAL
Physique	DUBOULOZ
Physique Médicale	ROUX
Thérapeutique	N...
Zoologie et Microbiologie	GREBUS
Toxicologie	VIALA

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM. BOUGEON René	Chirurgie
FARNARIER	Ophtalmologie
HOUEL	Chirurgie thoracique et Chirurgie du cœur
IMBERT	Chirurgie Générale
LAFFARGUE	Anatomie Pathologique
ORSINI	Pédiâtrie
PAYAN	Anatomie Pathologique
SERAFINO	Chirurgie
SERMENT	Obstérique et Gynécologie
TAMALET	Microbiologie
TISSIE	Oto-Rhino-Laryngologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	MM.	MM.
DESPIEDS	CORRIOL	JULLIEN
DESANTI	BARRET	DALMAS
GEVAUDAN		

MAITRES DE CONFERENCES — AGREGES

MM.	MM.	MM.
ACHARD	CHEVROT	GAUTHIER
ARDISSON	CODACCIONI	GASCARD
ARNOUX A.	COMBALBERT	GAYTE-SORBIER
BARET	COURBIER	GIRAUD F.
BATTESTI	CREVAT	GHIGLIONE
BERNARD P.M.	DALMAS	GRIMAUD
BOUYALA	DELMONT	GUERINEL
BIMAR	DOR	HUGUET
BUISSON	DUMON	IMBERT Paul
BUREAU	FRANÇOIS	Mme JOUVE
CARCASSONNE M.	FOURNIER	KAPHAN
CLAUSTRE	GARCIN	LANZA Maurice

UNIV. LEIDEN BIBL.

MM.	MM.	MM
LOUCHET	RICHAUD	SERMENT
MONGIN	RICHELME	SOULAYROL
MONTIES	ROLLAND	SPITALIER
MURATORE	SALAMON	TARANGER
NICOLI	SARACCO	TATOSSIAN
PLASSE	SARLES	TOGA
RAYBAUD C.	SEDAN	VITRY
REYNAUD	SEITE	ZWIRN

AGREGES EN EXERCICE

MM.	MM.	MM.
BERARD	COMITI	RUF
BREMOND	GARES	SARLES
BRICOT	JEAN	SIMONIN
CARCASSONNE Y	MICHOTEY	TEMINE
CASANOVA	MONGES André	TRIFAUD
COIGNET	REBOUD	

AGREGES LIBRES

MM.	MM.	MM.
BERTHIER	DEVIN	OLLIVIER
BOURRET	FIGARELLA	OURGAUD
CHAUVIN	GAMBARELLI	PAOLI

A MA MERE, A MES BEAUX-PARENTS

que j'adore

Humble témoignage de ma piété.

A MES SŒURS ET MES FRERES

que j'aime

Toute mon affection

A RONG,

admirable compagne de ma vie dont les mots les plus tendres ne sauraient exprimer la grâce et la vertu.

Tout mon amour

A MES ENFANTS, A MA FAMILLE

Toujours plus haut l'étendard !

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Christian DUMAZERT

Professeur de Chimie Générale

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie

de Marseille

Qui nous a accueilli dans son Laboratoire et nous a fait bénéficier de son magistral enseignement.

Qui nous a constamment manifesté la plus grande bienveillance.

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a inlassablement guidé au cours de ce travail.

Qui nous a fait le grand honneur de présider le Jury de notre thèse.

Hommage de notre profonde gratitude et de notre vive admiration.

A Monsieur le Professeur C. GREBUS

Professeur de Zoologie et de Microbiologie

à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

de Marseille

Qui a accepté de juger notre travail. Hommage de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur R. BARET

Professeur sans chaire

à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

de Marseille

Hommage de notre gratitude et de notre respect.

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur Agrégé C. GHIGLIONE

de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie

de Marseille

Qui n'a cessé de nous encourager et de nous soutenir dans notre travail.

Hommage de nos sentiments respectueux et reconnaissants.

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur Agrégé TRUONG VAN CHOM

Ancien Recteur de l'Université de Hue

Ancien Doyen de la Faculté de Pharmacie de Saïgon

dont les élèves se transmettent de promotion en promotion la renommée de grande éloquence, de riche personnalité et d'inaltérable bienveillance.

Dont la bonté et la modestie n'ont d'égales que ses vastes qualités professionnelles.

Qui nous a prodigué une sollicitude constante, un enseignement inestimable au cours de nos études et, plus tard, dans l'exercice de notre profession.

Hommage de notre profonde gratitude et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Docteur L. VOVAN

Assistant à la Faculté

de Médecine et de Pharmacie

de Marseille

Qui n'a pas épargné ses efforts pour nous aider à réaliser ce travail.

Témoignage de notre gratitude.

A TOUS MES CAMARADES

ET A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE DE CHIMIE

A TOUS NOS MAITRES

de la Faculté Mixte

de Médecine et de Pharmacie

de Saïgon

Hommage respectueux de notre reconnaissance et de notre attachement.

LES GLUCIDES DANS LE SANG

I. — *HISTORIQUE*

Le goût sucré du sang des diabétiques a été noté par Dobson en 1775 et par Cullen en 1776 peu de temps après que Dobson et Pool aient réussi à isoler le sucre à partir des urines de diabétiques. La présence probable de sucre dans le sang a été indiquée pour la première fois en 1831 par Tiedeman et Gmelin (30). Quinze ans plus tard, Frerich, par le test de réduction, a montré la présence de sucre dans le sang de la veine jugulaire. Ce résultat fut confirmé, dans le sang de la veine hépatique, par Magendie en 1847. L'année siuvante, Claude Bernard justifie les observations de Magendie mais n'a pas trouvé de sucre dans aucune autre partie du torrent circulatoire chez les Chien, en dehors de la veine hépatique et du cœur droit. Ce qui conduit l'auteur à penser que "le sucre est élaboré dans le foie et brûlé dans les poumons". La personnalité de Claude Bernard est telle que personne ne croit à la découverte de Figuier qui, en 1855, trouve l'existence de sucre dans toutes les parties de la circulation sanguine. Cependant, en 1856, après des études qualitatives et quantitatives, Chauveau (9) montre que les sang artériel et veineux renferment tous les deux du sucre avec une prédominance toutefois dans le sang artériel. En outre, l'auteur démontre que la lymphe renferme également du sucre et que la concentration de sucre dans le sang est constante, qu'elle ne dépend pas de la diète et qu'elle persiste même après un jeûne prolongé. Ces notions sont reconnues en 1859 par plusieurs auteurs et par Claude Bernard lui-même. Ce dernier, en 1857 découvre l'existence de glycogène dans le foie (2) et réussit à provoquer la glycosurie par sa fameuse piqûre du plancher du IV^{me} ventricule.

II. — *NATURE DES SUBSTANCES REDUCTRICES DANS LE SANG*

Par les techniques de réduction habituelles, on détermine la teneur d'autres éléments réducteurs dans le sang que le glucose. Cette teneur est de 80 à 120 mg de sucrec réducteurs pour 100 ml de sang, chez l'homme normal dans la période post-prandiale. Pickard en 1892 démontra que la plus grande partie de ces sucres est constituée par le glucose en identifiant ce dernier sous forme d'osazone. Opérant sur des quantiéts de 80 à 100 ml de sang, Best

(3) trouve dans le sang humain 47 à 82 mg de glucose pour 100 ml de sang ; le reste, soit 19 à 31 mg représente les sucres non fermentescibles par la levure pure. Par la suite, Somogyi (29) et d'autres auteurs montrent que leur concentration dans le sang ne varie pas, que l'organisme soit dans les conditions physiologiques ou pathologiques, alors que le glucose subit des variations sensibles dans ces mêmes conditions.

La nature de ces sucres a préoccupé un grand nombre de chercheurs. De nombreux travaux vont être consacrés à l'étude des glucides combinés du sang. Il est aujourd'hui bien établi que les hydrolysats de sang obtenus par action des acides à chaud contiennent des glucides parmi lesquels le galactose, le mannose et la N.acétylglocosamine ont été identifiés. Des travaux modernes basés sur la chromatographie sur papier ou sur résines échangeuses d'ions confirment ces résultats et laissent supposer qu'il existe d'autres glucides tel que l'acide neuraminique. Les différents oses ainsi libérés doivent être considérés comme faisant partie intégrante des protéines sériques dans lesquelles ils se trouvent sous la forme de polyosides. Cette fraction glucidique est caractérisée par la très grande solidité de sa liaison avec les protéines. Elle est désignée sous le nom de sucre protéique (Bierry, 4).

A côté du glucose libre, du sucre protéique, il existe dans le sang du sucre combiné très différent chimiquement et biologiquement du sucre protéique que nous venons de décrire.

Lépine distingue le sucre fortement combiné, identifiable au sucre protéique, et un sucre faiblement combiné, ou "sucre virtuel", parmi les sucres combinés du sang.

En résumé, on admet actuellement que les glucides sanguins comportent essentiellement le glucose et une faible quantité de sucres libres d'une part et les sucres combinés d'autre part.

Il est certain que l'étude des glucides du sang pose le problème des techniques analytiques dont les applications au sang se heurtent à de sérieuses difficultés. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce sujet.

III. — *ROLE BIOLOGIQUE DES DIFFERENTES FRACTIONS DES GLUCIDES SANGUINS*

La constatation d'une glycémie se maintenant à un taux constant a dirigé les physiologistes vers la découverte du système régulateur de la glycémie. Ainsi s'est précisé le rôle de l'adrénaline, de l'insuline et de la participation à cette régulation, de la thyroïde, de l'hypophyse et du système nerveux central. La constance de la glycémie est l'expression de l'équilibre dynamique qui s'établit dans l'organisme entre la synthèse et la dégradation permanente des glucides.

Le catabolisme glucidique est au centre du métabolisme intermédiaire, non seulement parce que le sucre est l'aliment énergétique par excellence, mais aussi parce que le catabolisme des autres aliments (protides, lipides) emprunte les voies cataboliques des glucides. On peut dire que toutes les cellules possèdent les structures nécessaires au catabolisme glucidique. Ce catabolisme conduit à la formation de CO_2 et d'H_2O selon la réaction globale :

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

Mais entre les deux termes de cette équation chimique, existent de très nombreuses étapes intermédiaires.

Le sucre absorbé par l'intestin passe immédiatement dans la circulation, puis dans le liquide extracellulaire. La première étape de son métabolisme est son passage dans le milieu intracellulaire.

La figure 1 représente le schéma général du catabolisme glucidique.

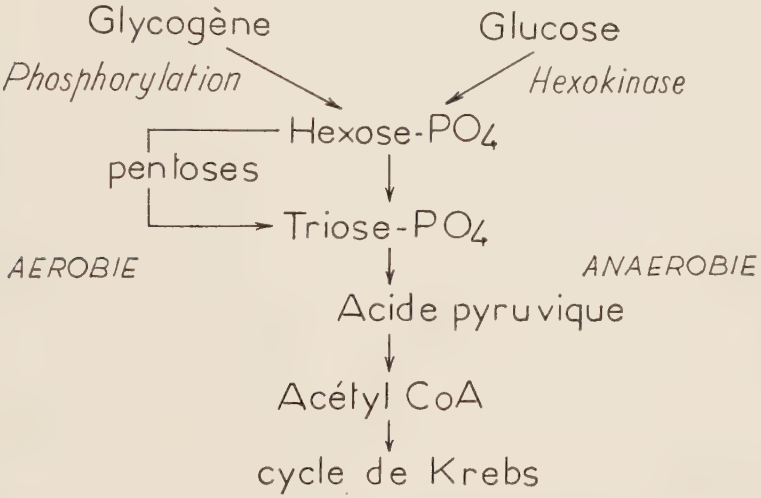


FIG. 1. — Catabolisme glucidique.

Les deux fournisseurs : glycogène et glucose, l'un et l'autre après phosphorylation, produisent les hexoses-phosphates, lesquels après diverses transformations se scindent en deux trioses-phosphates. Chacun de ces trioses phosphates fournit une molécule d'acide pyruvique : molécule clé du métabolisme intermédiaire.

Cette partie du métabolisme est peu énergétique. Elle peut se faire, soit par voie anaérobie (Embden-Meyerhof), soit par voie aérobie (Warburg, Dickens, Lipmann).

L'acide pyruvique est ensuite dégradé en libérant de fortes quatnités d'énergie à l'intérieur du cycle de Krebs par voie uniquement aérobie. Il est utile de rappeler que le cycle de Krebs peut

être produit par toutes les cellules et que ce sont les mitochondries qui possèdent toutes les enzymes nécessaires à cette série de réactions.

Anabolisme glucidique : Les sucres de l'organisme peuvent provenir d'un grand nombre de sources, mais il est nécessaire que chacune de ces sources puisse former du glucose, du fructose ou du ribose, car seuls ces sucres sont utilisables dans le cycle du catabolisme glucidique.

Nous distinguerons les sources alimentaires et les sources endogènes.

1° Les sources alimentaires :

— le glucose, produit de dégradation des polyosides, pénètre dans l'organisme après phosphorylation à travers la barrière intestinale. Il circule dans le sang sous forme de glucose libre et suit ensuite la voie anabolique ou catabolique normale. La voie anabolique aboutit à la mise en réserve d'abord par stockage lacunaire, ensuite sous forme de glycogène hépatique ou musculaire, enfin sous forme de réserves lipidiques.

— le fructose traverse aussi la barrière intestinale après phosphorylation. Dans le foie, sous l'action de la fructokinase et de l'ATP, se forme le fructose-1-phosphate qui s'incorpore normalement au cycle du glucose au niveau du fructose-diphosphate. Il peut être aussi métabolisé de façon indépendante jusqu'au glycéraldéhyde et rejoindre alors les sucres en C_3.

— le galactose traverse aussi la barrière intestinale par phosphorylation. Le passage du galactose au glucose s'effectue grâce à un mécanisme enzymatique complexe. Le galactose est d'abord phosphorylé par la galactokinase et l'ATP. Puis la galactotransférase en présence d'un transporteur, l'uridine diphosphate, assure la transformation du galactose en glucose. C'est l'absence de transférase qui est responsable de la galactosémie congénitale.

— enfin, les pentoses se transforment en glucose par les voies de passage qui se situent au niveau du glycéraldéhyde.

2° Les sources endogènes : Théoriquement les diverses voies du catabolisme anaérobie et aérobie sont réversibles ; il est donc possible à chaque élément de la glycolyse et du cycle de Krebs de remonter toutes les étapes et de reformer une molécule de glucose ou de glycogène. En fait, la réversibilité des réactions s'interrompt sur un point : au niveau de l'acide pyruvique. En effet, dans la glycolyse, celui-ci provient directement de l'acide phosphoénolpyruvique. Dans la resynthèse, la remontée de l'acide pyruvique à son précurseur s'effectue par une voie détournée. Il est à noter que la synthèse est consommatrice d'énergie et que la disparition d'une certaine quantité de "matière première" est nécessaire et que si l'anabolisme glucidique conduit toujours au glycogène, il ne conduit pas toujours au glucose libre. Le muscle ne possède pas l'enzyme permettant de déphosphoryler le glucose-

6-phosphate ; il est donc incapable de libérer du glucose dans le liquide extracellulaire. Aussi le glycogène musculaire ne peut servir à recharger la glycémie, à moins que l'acide lactique produit n'ait été véhiculé par le sang jusqu'au foie et transformé en glycogène hépatique, ce glycogène étant capable, lui, de donner le glucose libre.

Les lipides constituent une forme de réserve très importante pour les glucides. Le passage des glucides aux lipides, dans un sens ou dans l'autre est lié au rôle de la coenzyme A.

Les protides glucoformateurs peuvent rejoindre le métabolisme des sucres par diverses voies : l'alanine (acide aminé en C_3) rejoint le mtéabolisme des trioses phosphates par sa désamination en pyruvate ; les autres aboutissent à la formation de l'acide glutamique, lequel s'incorpore directement au cycle de Krebs par la voie de l'α céto-glutarate ; enfin, l'acide aspartique, après passage dans le cycle de l'urée fibère le fumarate qui entre dans le cycle de Krebs.

Cette vaste usine chimique aux multiples possibilités assure en définitive l'harmonieuse croissance et l'efficace activité de l'organisme. Elle ne peut obtenir ce résultat que grâce à des mécanismes régulateurs extrêmement précis et remarquablement réglés.

Le dérèglement de ces mécanismes régulateurs a d'importantes répercussions : le diabète sucré est caractérisé par un trouble du métabolisme des glucides se manifestant, dans les conditions d'alimentation habituelle par une hyperglycémie et une glycosurie. Le plus souvent, cette affection est découverte au cours d'un examen systématique qui met en évidence la glycosurie. Quelquefois, c'est un fait clinique qui la révèle. Dans tous les cas, un bilan du diabète est nécessaire et on note ici toute l'importance des signes biologiques. Le bilan biologique peut comporter des examens et des tests allant de l'étude glycémique simple aux épreuves dynamiques d'association. Le bilan couramment prescrit comprend le dosage de la glycémie à jeûn et l'étude de l'hyperglycémie provoquée par ingestion de glucose.

Le sucre protéique, du fait qu'il est très stable et solidement fixé aux protéines sériques, apparaît à priori comme devant présenter une inertie relativement grande quant à sa participation aux réactions métaboliques. Ce caractère de stabilité est en accord avec le rôle plastique du sucre protéique. La proportion de ses différents oses de constitution s'est révélée différente selon les espèces animales. Chez les individus d'une même espèce, on a vu se modifier la composition du sucre protéique au cours de certaines maladies infectieuses. C'est ainsi que chez les tuberculeux, les néphrétiques, les cancéreux, les malades atteints de diabète insipide, on observe une élévation du taux du sucre protéique en rapport avec la gravité de l'affection (Bierry et Rathery, 5).

Le sucre faiblement combiné libéré de sa combinaison par les acides faibles ou par les acides forts en solution très diluée, participe à la glycolyse sanguine et, sous l'influence des hormones glycorégulatrices, subit des variations inverses de celles de la glycémie libre (Dumazert, 13). Le comportement du sucre faiblement combiné au cours de la glycolyse sanguine évoluant en présence de formateurs de complexes métalliques (effecteurs de phosphatases et de pyrophosphophatases) permet de le considérer comme un ester phosphorique.

IV. — *MALADIES DU METABOLISME DES GLUCIDES AUTRES QUE LE DIABETE SUCRE*

On peut grouper, sous cette rubrique, les affections suivantes : fructosurie et intolérance du fructose, galactosémie, pentosurie essentielle et glycogénoses.

1° *Fructosuries. — La fructosurie alimentaire* est temporaire et se rencontre après ingestion importante de fruits. La *fructosurie hépatique* apparaît comme un phénomène secondaire de l'atteinte hépatique grave (cirrhose, ictère grave, hépatite, stéatose hépatique au cours du diabète en particulier). Dans ces cas, le foie est incapable de transformer le fructose en glycogène.

La fructosurie essentielle est considérée comme une "erreur innée" du métabolisme, liée à un déficit enzymatique congénital, se transmettant suivant le mode récessif. Le foie est incapable de métaboliser le fructose faute de fructokinase. L'examen clinique ne révèle rien d'anormal, seule l'épreuve de fructosurie provoquée confirme cet état en montrant l'élévation du lévulose sanguin et urinaire.

L'intolérance héréditaire du fructose se distingue de la fructosurie essentielle par une intolérance au fructose très marquée. Les surcharges en fructose entraînent une élévation anormale de la fructosémie et une hypoglycémie accompagnée de troubles graves tels que tremblement, sudation et vomissements. Le défaut enzymatique se situerait au niveau de la 1-phospho-fructoldolase (fig. 2), enzyme réalisant la scission du fructose-1-phosphate en phosphodioxyacétone et en glycéraldéhyde.

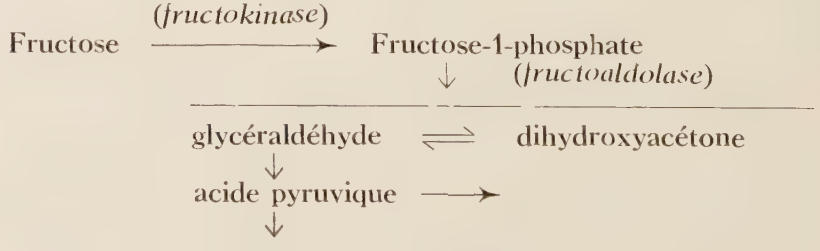


FIG. 2. — Métabolisme du fructose.

2° *Galactosémie.* — La galactosémie est une maladie héréditaire et caractérisée par un blocage du métabolisme du galactose. Rappelons que ce métabolisme s'effectue par une série de réactions :

(1) Galactose + ATP $\xrightarrow{(galactokinase)}$ Galactose-1-P + ADP

(2) Gal-1-P + UDPG $\underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{(galactotransférase)}}$ UDPGal + Glucose-1-P

(3) UDP-galactose $\underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{(galactowaldénase)}}$ UDP-glucose

(4) UDP-glucose + PP $\rightleftharpoons$ UTP + glucose-1-P

Les premières manifestations de l'affection apparaissent le plus souvent dès la première semaine de la vie, peu après le début de l'alimentation lactée. On note un déficit en galactotransférase (galactose-1-phosphate uridyl-transférase).

Le bilan biologique comporte la détermination de l'activité de la galactose-1-phosphate uridyltransférase. Ce test est spécifique et, en révélant la carence des hématies en cette enzyme, il apporte une preuve formelle de la maladie. L'épreuve d'hypergalactosémie provoquée, faute de pouvoir pratiquer l'enzymologie, présente également une grande valeur diagnostique. Elle ne doit être pratiquée toutefois, qu'avec une extrême prudence, car elle peut entraîner hypoglycémie et hypokaliémie graves.

3° *Pentosurie essentielle.* — C'est une affection familiale héréditaire, caractérisée par l'excrétion urinaire de pentose à des taux dépassant le plus souvent le gramme par 24 heures. Le pentose éliminé est le L-xylulose qui, normalement, se métabolise en xylithol puis en D-xylulose. Les pentosuriques n'ont pas la possibilité, faute de xylithol-déshydrogénase de métaboliser le L-xylulose. Ce blocage métabolique a comme conséquence de rompre le cycle des acides uroniques et le L-xylulose est sécrété comme tel.

4° *Glycogénoses.* — Elles sont caractérisées par l'accumulation de glycogène au niveau de certains organes : le foie, le foie et les reins ou encore le foie et les muscles. On distingue à l'heure actuelle : la glycogénose hépato-rénale par *déficit en glucose-6-phosphatase* et réalise le type I de Cori ; — la glycogénose hépato-musculaire par *déficit en amylo-1-6-glycosidase* du type III de Cori ; — la glycogénose par *déficit en phosphorylase hépatique.* Nous citerons pour mémoire les glycogénoses type II de Cori ou glycogénose cardiaque et type IV de Cori lié à un stockage de

glycogène anormal dans le foie et dont l'évolution se fait vers une cirrhose rapidement mortelle.

Les examens biologiques consistent essentiellement à déterminer les déficits enzymatiques sur les ponctions biopsies hépatiques et musculaires. C'est le domaine des laboratoires très spécialisés. Les analyses d'orientation comportent la détermination des courbes de variation de la glycémie, de la galactosémie et de la lactacidémie après une charge par voie veineuse du galactose. On peut compléter ces examens par une hyperglycémie à l'adrénaline ou au glucagon. Les résultats de ces investigations permettent d'apporter des arguments en faveur d'une glycogénose dont la nature sera déterminée par l'enzymologie.

PROBLEMES POSÉS PAR L'ÉTUDE BIOLOGIQUE DES MALADIES DU METABOLISME DES GLUCIDES

I. — *DIABETE SUCRE*

Le bilan biologique du diabète groupant les épreuves les plus communes comporte la glycémie à jeûn, la glycosurie et les épreuves d'hyperglycémie provoquée.

1) *Glycémie à jeûn.* — Les méthodes de dosage du glucose sont nombreuses et essentiellement basées sur le pouvoir réducteur du glucose. Les réactifs oxydants les plus divers ont été proposés et leur sensibilité maximum se manifeste toujours en milieu alcalin.

Les techniques les plus employées sont, en France, celles de Baudoin-Lewin et d'Hagedorn ; en Amérique, celle de Somogyi-Nelson.

Le prélèvement doit être effectué sur un anticoagulent et en présence d'un inhibiteur de la glycolyse spontanée liée aux éléments figurés du sang : le fluorure de sodium répond à ces deux nécessités. Le dosage doit être fait sur le plasma ou sur sang total, mais non sur sérum. Les microdosages effectués sur sang capillaire (dont la glycémie est identique à celle du sang artériel) conduisent à des chiffres légèrement supérieurs à ceux obtenus à partir du sang veineux.

La méthode de *Folin et Wu* consiste à chauffer le sang déféqué au réactif sulfotunstique avec une solution cupro-alcaline ; l'oxyde cuivreux formé est dosé colorimétriquement par action sur un réactif phosphotungstomolybdique qui, réduit, se colore en bleu.

C'est une bonne méthode mais prêche par l'instabilité de la coloration développée.

La méthode de *Baudoin-Lewin* consiste, après défécation des protéines par le nitrate de mercure, à faire agir à chaud une solution alcaline d'iodomercurate. La réduction du réactif par le glucose libère du mercure métallique ; celui-ci est dissous dans un volume donné de solution titrée d'iode dont l'excès est dosé par

une solution titrée d'hyposulfite de sodium en présence d'empois d'amidon.

Ces techniques nécessitent une prise de sang veineux de 5 ml environ.

La microméthode de *Hagedorn et Jensen*, précédée de la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium selon Dumazert (12) a le mérite de n'exiger que 0,1 ml de sang obtenu par prélèvement capillaire. En outre, la déprotéinisation cadmique conduit à une solution qui renferme le minimum de substances parasites. Son principe est basé sur la réduction en milieu alcalin et à chaud du ferricyanure de potassium en ferrocyanure. Le ferricyanure non réduit est titré par iodométrie. Cette technique conserve la préférence des analystes les plus avertis.

La méthode de *Somogyi-Nelson* (28) est la plus employée aux Etats-Unis. Elle utilise le réactif arsénio-molybdique de bonne conservation et un réactif cupro-alcalin. La coloration finale est stable et son estimation photométrique par rapport à une gamme-étalon de solutions de glucose est aisée. Elle s'adapte particulièrement aux analyses en série. Elle peut être effectuée soit sur du sang veineux, soit sur du sang capillaire.

La méthode de *Hultman* (17) fait appel à un principe différent. Elle consiste en la spectrophotométrie de la coloration donnée par les aldoses chauffés dans l'acide acétique concentré en présence d'ortho-toluidine.

Enfin, les dosages en série justifient le recours à une *méthode d'automation*. Cette dernière, préconisée par Skeggs et Marsh en 1957, eput être appliquée grâce à un autoanalyseur tel que celui fabriqué par la firme "Technicon-Instruments Corporation".

Toutes les méthodes colorimétriques de dosage du glucose peuvent être mises en œuvre dans ce cas. La technique habituellement employée est une modification de celle d'Hoffman. On mesure la diminution de la coloration jaune du ferricyanure de potassium en milieu alcalin, réduit à chaud par le glucose en ferrocyanure presque incolore. La réaction est catalysée par le cyanure de potassium. Le sang est dilué par le liquide physiologique de façon à ne pas être hémolysé avant d'être dialysé.

L'appareil compare la concentration du glucose à celle d'un échantillon standard. Les prises d'essai sont prélevées, pompées et mélangées à un courant de diluant. Le mélange se déplace à travers un dialyseur où ses éléments diffusibles sont séparés et envoyés dans un courant réactif. Ce dernier, réchauffé par un thermostat, aboutit à un colorimètre relié à un enregistreur qui inscrit une réponse sur du papier graphique mobile.

Toutes ces techniques chimiques sont basées sur les réactions d'oxydoréduction. De telles réactions réagissent non seulement sur le glucose mais sur d'autres substances possédant un groupement carbonyle (=C=O) malgré les efforts déployés par les

auteurs tels que Dumazert pour obtenir une déprotéinisation correcte.

La seule méthode pour doser le "glycose vrai", connue avant l'ère des enzymes, consiste en la fermentation du glucide par la levure. Mais cette technique est trop complexe et trop longue pour être comptée parmi les analyses de routine. Le véritable but visant la spécificité du dosage n'est atteint qu'avec les procédés utilisant la glucose-oxydase.

Nous reviendrons sur les détails de cette technique. Disons dès maintenant qu'en ce qui concerne la détermination de la glycémie à jeûn dans un but de dépistage ou d'orientation clinique, les techniques chimiques utilisant 0,1 ml de sang, et même 5 ml de sang chez les adultes, sont largement suffisantes. Il faut noter que ces différentes techniques n'aboutissent pas à une détermination identique. Les chiffres physiologiques par litre de plasma sont de 0,90 g à 1,30 g avec les procédés d'Hagedorn et de Folin, de 0,80 g à 1,20 g avec la méthode de Baudoin Lewin, de 0,70 g à 1,18 g avec la technique de Somogyi-Nelson.

2) *Epreuve d'hyperglycémie provoquée par administration de glucose.* — Le but de ces épreuves est d'étudier la réponse dynamique sanguine à une sollicitation hyperglycémiante et d'individualiser ainsi des états pathologiques qui risqueraient d'être méconnus sans elles.

Les techniques se sont individualisées en fonction de la quantité de glucose donnée, de sa voie d'administration, de l'horaire des prélèvements sanguins. La voie orale est la plus utilisée. Le sujet, à jeûn depuis 12 heures au moins, ingère une dose déterminée de glucose (1 g/kg). L'absorption de glucose a lieu au temps 0 ; elle est précédée d'un prélèvement sanguin permettant la détermination de la glycémie de base. Les prélèvements ultérieurs sont habituellement réalisés à la 30e, 60e, 90e, 120e et 180e minute. On suit ainsi les variations de la glycémie.

Chez le sujet normal, la glycémie ne s'élève pas plus de 0,60 g/l au-dessus du taux initial. Cette flèche se produit dans la première heure. La glycémie revient à son taux initial en 90 minutes en moyenne.

A l'état pathologique les modifications peuvent porter sur la hauteur de la flèche qui peut atteindre 2 g/l et au-delà et sur la durée de la vague hyperglycémique.

Quelquefois l'épreuve buccale peut être perturbée par des facteurs digestifs, on utilise alors la voie veineuse pour administrer du glucose. Le test de tolérance au glucose par voie intraveineuse consiste à injecter une dose fixe de glucose, soit 25 g chez l'adulte sous forme de 50 ml de solution à 50 p. 100 en 2 à 3 minutes, à un sujte à jeûn depuis 13 heures. La glycémie est effectuée avant l'injection et toutes les 15 minutes après, pendant une heure.

3) *Hyperglycémie provoquée par le glucagon.* — Le glucagon est l'hormone isolée des îlots alpha de Langherans à action glycogénolytique. Son injection par voie intraveineuse, à raison de 1 mg par m2 de surface corporelle, provoque chez le sujet normal une augmentation franche de la glycémie. La flèche moyenne est de 0,50 g à 0,60 g/litre au-dessus du taux initial. Elle s'annule entre le 60e et la 90e minute. Chez les diabétiques, les réponses à cette épreuve sont variables. Dans les glycogénoses, ce test apporte un argument péremptoire.

4) *Hyperglycémie adrénalinique.* — L'administration sous-cutanée d'un milligramme d'adrénaline par m2 de surface corporelle provoque une flèche hyperglycémique atteignant en moyenne 50 p. 100 du taux initial dans l'heure suivante. Une flèche réduite est rencontrée chaque fois que le glycogène hépatique est diminué.

5) *L'enregistrement continu de la glycémie* durant une période prolongée a été rendu possible grâce à l'autoanalyseur. Les tracés de cette méthode donnent une image fidèle des variations spontanées de la glycémie et constituent un excellent moyen d'étude des mécanismes hémostatiques de la glycémie.

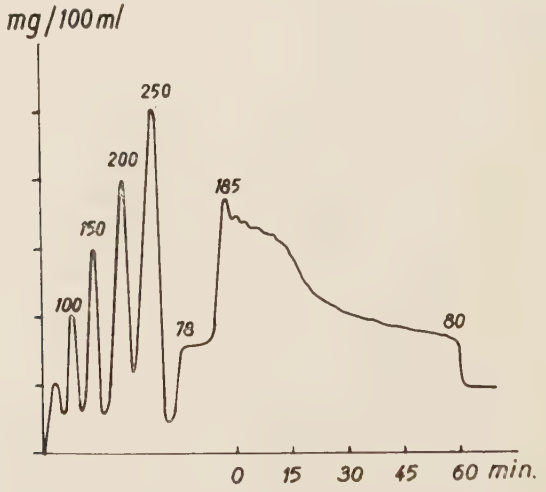


FIG. 3. — Hyperglycémie après injection rapide de 10 g de glucose IV. Sujet normal (d'après Castaigne, Combier et Schuller, 7).

Il est important de noter que si le taux de glucose dans le sang artériel ou capillaire présente une différence négligeable avec le taux de glucose dans le sang veineux dans les cas physiologiques, il n'en est pas de même dans les cas pathologiques et dans les épreuves d'hyperglycémie provoquée.

Himsworth (15) montre que chez un adulte jeune normal, après ingestion de 50 à 100 g de glucose, la concentration de glu-

cose augmente plus rapidement et plus fortement dans le sang capillaire que dans le sang veineux.

La figure n° 4 représente les courbes de variations de la glycémie au cours d'une épreuve d'hyperglycémie provoquée chez un adulte, déterminées dans le sang capillaire et dans le sang veineux.

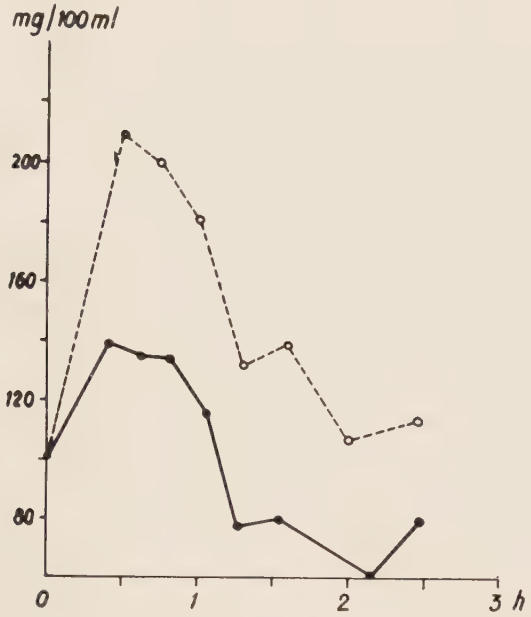


FIG. 4. — Variations de la glycémie après ingestion de 100 g de glucose par un adulte jeune et sain (d'après Foster, 14).
En trait plein : sang veineux.
En trait discontinu : sang capillaire.

II. — *DIABETES EXPERIMENTAUX ET ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DES DROGUES*

La création, chez l'animal, de diabètes expérimentaux a non seulement pour but d'étudier les perturbations métaboliques accompagnant l'état diabétique, mais encore d'éprouver l'action antidiabétique de nouvelles drogues, en déterminant l'action curative ou l'action préventive que ces substances sont susceptibles d'exercer vis-à-vis d'un diabète expérimental.

En se basant sur leur mécanisme pathogénique, on peut dresser le tableau suivant des divers diabètes expérimentaux :

— diabète par ablation chirurgicale : pancréatectomie ;

— diabète par administration continue de facteurs provoquant un hyperfonctionnement langheransien ; les substances

injectées sont : extraits de lobe antérieur de l'hypophyse (diabète hypophysaire), extraits thyroïdiens (diabète thyroïdien), extraits cortico-surrénaux (diabète surrénalien), glucose (diabète glucidique) ;

— diabètes par destruction chimique de la glande : diabète par l'alloxane, diabète par la dithizone et diabète par le diazoxide.

On peut distinguer pour chaque diabète deux variétés suivant qu'on obtient une insuffisance relative du pancréas ou un épuisement irréversible de la glande.

Si l'on excepte les diabètes provoqués par l'administration des diverses hormones (diabètes possédant des caractères particuliers par les lésions anatomiques et par l'aspect de l'hyperglycémie) et le diabète par pancréatectomie, qui est délicate à réaliser et dont les complications post-opératoires fréquentes laissent une mortalité élevée des animaux opérés, l'expérimentation courante fait surtout appel aux diabètes glucidiques, alloxanique et diazoxidique.

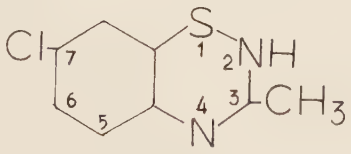
Parmi les diabètes expérimentaux, une place de choix doit être faite au *diabète alloxanique,* eu égard à l'action quasi spécifique de l'alloxane au niveau des cellules insulino-secrétrices.

L'alloxane est une substance connue depuis longtemps puisque Wohler l'a identifiée dès 1838 comme un produit d'oxydation de l'acide urique. Obtenue par condensation d'une molécule d'urée avec une molécule d'acide mésoxalique, l'alloxane répond à la structure chimique suivante :

C'est un corps peu stable, même à l'état solide ; il subit facilement une hydrolyse en produits voisins, la plupart dépourvus d'action diabétogène. Aussi, le diabète permanent par l'alloxane est plus ou moins aisément reproduit selon les espèces. Le Chien, le Lapin, le Rat, le Mouton et le Singe sont parmi les animaux les plus sensibles. L'action diabétogène de l'alloxane se traduit par un dégranulation spécifique des cellules β des îlots de Langherans. Il en résulte que le diabète obtenu sera d'autant plus intense que l'altération des cellules insulinosécrétrices sera plus complète. D'après Merklen (22), il est nécessaire de déterminer avec le plus de précision possible la dose optima nécessaire à l'obtention d'un syndrome diabétique avec une mortalité réduite. L'auteur indique des doses de l'ordre de 200-400 mg par kg de poids chez le Rat par injection d'une dose unique sous-cutanée. La vitesse d'injection constitue elle-même un des facteurs importants à considérer, au même titre que la provenance de l'alloxane et de son état de conservation.

Le syndrome de l'intoxication alloxanique peut se diviser en trois phases : dans un premier temps n'excédant pas deux heures, apparaît une phase *hyperglycémique transitoire* qui est bientôt suivie, entre la troisième et la dixième heure, d'une seconde phase caractérisée par une *hypoglycémie intense* avec convulsions. Cette phase persiste jusqu'à la quatorzième heure. Si l'animal a survécu, il entre dans une dernière phase *hyperglycémique* qui, d'après l'importance de la lésion pancréatique initiale et la capacité régénératrice de son pancréas, sera transitoire ou permanente. Le diabète constitué est caractérisé par une glycémie élevée, avec glycosurie importante, ce qui accentue le phénomène de polyphagie, de polydipsie et de polyurie. Les animaux accusent un amaigrissement important.

L'étude du diabète provoqué par le *diazoxide* est de date récente. Le diazoxide ou 2H 1-2-4-benzothiadiazine-7 chloro-3 méthyl répond à la formule suivante :



Le diazoxide

Son action diabétogène est étudiée chez le Chat par Carminati (1964, 6) en administration par voie sous-cutanée et chez le Rat par Ralph et Roelf (1964, 24) en injection intra-péritonéale.

Loubatières et ses collaborateurs (1966, 21) montrent que l'action hyperglycémiante de cette substance est due à la libération des catécholamines provenant de la surrénale et de sources extra-surrénales et à la réduction de la sécrétion basale d'insuline.

L'hyperglycémie déclenchée par le diazoxide est transitoire. Par voie intrapéritonéale, elle s'observe dès la deuxième heure et disparaît vers la sixième heure.

Chez le Lapin, on se contente souvent d'observer la chute de la glycémie à la suite de l'administration du produit hypoglycémiant en déterminant la glycémie toutes les heures, puis toutes les trois heures pendant vingt-quatre heures.

On étudie également l'action de l'hypoglycémiant qui s'oppose à l'élévation glycémique provoquée par l'administration à l'animal d'une dose déterminée de glucose.

***

L'exposé de ces divers moyens d'études clinique et expérimentale du diabète montre que ces épreuves exigent un nombre important de prélèvements sanguins. Si le problème est relative-

ment facile à résoudre chez les adultes, il se pose par contre d'une manière aiguë lorsqu'on a affaire aux nourrissons, aux jeunes enfants ou aux petits animaux de laboratoire. On conçoit aisément le grand danger que présentent les saignées trop abondantes ou trop souvent répétées. Cela souligne l'intérêt des microméthodes analytiques et *a fortiori* les ultramicrométhodes.

III. — *EXPLORATION FONCTIONNELLE DES AUTRES MALADIES DU METABOLISME GLUCIDIQUE*

D'une manière générale, les épreuves de glucidémie provoquée faisant appel à d'autres glucides que le glucose sont mises en œuvre pour déceler chez les nourrissons et chez le jeune enfant les déficits enzymatiques. Deux épreuves sont souvent employées en médecine infantile : la galactosémie provoquée et la fructosémie provoquée.

On est alors en présence de deux glucides à déterminer dans le sang pour établir le bilan ; cela nécessite un double dosage. Lorsqu'on a un mélange de glucose et de galactose à doser, on doit utiliser une méthode globale donnant la teneur en sucres réducteurs et d'une méthode spécifique permettant de déterminer le taux de l'un des deux sucres.

Lorsqu'on est en présence d'un mélange de fructose et de glucose, on utilise deux méthodes spécifiques.

Ici le problème analytique est double :

— utiliser des techniques exigeant un minimum de sang puisque chaque épreuve, en général pratiquée chez les petits-enfants demande au moins seize prélèvements ;

— donner spécifiquement le glucose en présence d'autres sucres.

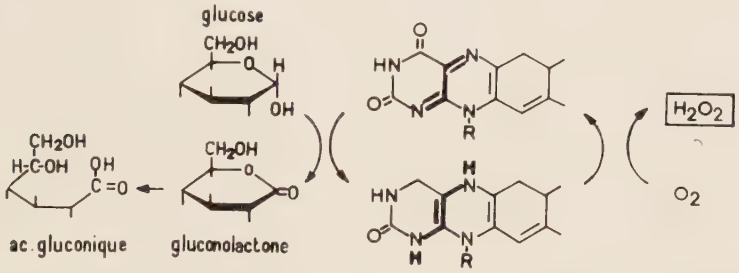
La technique utilisant la glucose-oxydase permet de résoudre le second problème. Ici encore les progrès sont très sensibles depuis le début de sa mise au point

DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUCOSE

LA GLUCOSE-OXYDASE

Découverte par Muller (23) et préparée à l'état pur par Coulthard et ses collaborateurs (11), la glucose-oxydase est une enzyme extraite de *Penicillium notatum*. C'est une flavoprotéine possédant deux groupements prosthétiques par molécule de protéine. Son poids moléculaire est de 149 000 (Cecil et Orgston, 8) et son pH optimum d'action est aux environs de 5,6. Le groupement prosthétique est identifié à l'alloxazine-adenine-dinucléotide (Keilin et Hartree, 18).

La glucose-oxydase oxyde le glucose en gluconolactone qui, en présence de l'eau se transforme en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



La spécificité pour le glucose est très grande. En effet, Keilin et Hartree (19) ont montré que sur 50 glucides étudiés, seuls quelques-uns réagissent avec la glucose-oxydase, mais en quantités extrêmement faibles. Dans les mêmes conditions expérimentales, lorsque 100 grammes de glucose sont oxydés, les quantités suivantes des autres oses sont attaquées par l'enzyme :

6-méthylglucose	1,85 g
4-6 diméthylglucose	1,22 g
mannose	0,98 g
galactose	0,14 g

La technique de dosage utilisant la glucose-oxydase repose sur une réaction enzymatique couplée (réaction de Keston, 20) :

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow[\text{(glucose-oxydase)}]{} H_2O_2 + \text{ac. gluconique}$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow[\text{(peroxydase)}]{} 2\,H_2O + D\ \text{(coloré)}$$

Une peroxydase décompose le peroxyde d'hydrogène et oxyde catalytiquement un donneur d'hydrogène (DH_2) qui passe d'une forme réduite incolore à une forme oxydée colorée. La proportionnalité qui existe entre le glucose initial et la coloration finale permet un dosage colorimétrique.

Les chromogènes DH_2 les plus utilisés sont : l'ortho-toluidine, l'ortho-dianisidine et le 2-6-dichlorophénol-indophénol.

C'est à Hugget et Nixon (16) et à Saifer et Gerstenfield (26) qu'on doit la mise au point et la codification de la méthode de dosage.

Les enzymes utilisées par ces auteurs sont commercialisées soit séparément (Sigma Chemical Company - U.S.A.) soit en un mélange avec l'ortho-dianisidine, sous le nom de "glycostat" (Worthington Biochemical Corporation).

Le dosage s'effectue sur une prise d'essai de 0,1 ml de sang total ou de plasma, prélevé sur héparine ou sur fluorure de sodium. La déprotéinisation est assurée par l'hydroxyde de zinc, l'hydroxyde de baryum ou l'hydroxyde de cadmium ou encore par l'éthanol.

La réaction enzymatique se déroule dans un tampon phosphate pH = 7 (pH optimum d'activité du mélange des deux enzymes), pendant soixante minutes et à la température de 37°C. La coloration brune développée est stable pendant plusieurs heures.

Cette technique, qui marque déjà un très grand pas en avant dans l'évolution du dosage du glucose dans le sang, reste perfectible. On lui reproche notamment de donner des résultats peu reproductibles et surtout d'exiger encore 0,1 ml d sang, ce qui continue à représenter un handicap quand on pratique le prélèvement à l'extrémité du doigt chez les nourrissons et chez les enfants.

Aussi, cherche-t-on à l'améliorer : réduire la prise d'essai tout en conservant sa sensibilité et la rendre plus reproductible.

OBJET DU TRAVAIL

Le but de notre travail est précisément de mettre au point la technique d'ultramicrodosage du glucose vrai dans le sang et de rechercher ses limites d'application en Biologie clinique et expérimentale. Cette technique, décrite par Richterich et Colombo (25) exige une prise de sang capillaire minime : 0,02 ml.

Nous nous sommes attaché dans le premier chapitre à faire une étude critique de cette méthode et de rapporter les résultats obtenus chez les enfants non diabétiques ; ce qui nous permettra de situer les valeurs de la glycémie déterminée dans ces conditions. Nous aborderons également une étude comparative des résultats obtenus simultanément en appliquant cette méthode et celle de Hagedorn et Jensen.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons ses applications possibles en médecine infantile, notamment dans l'exploration du métabolisme glucidique (*).

Nous verrons dans le dernier chapitre quels sont les services que pourrait rendre une telle technique au cours de l'étude expérimentale du diabète et de l'action hypoglycémiante de certaines drogues, chez l'animal.

---

* Cette partie du travail a pu être menée grâce à l'extrême obligeance de Monsieur le Professeur Orsini, dans le service duquel les analyses ont été effectuées.
Nous prions Monsieur le Professeur Orsini de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER

ULTRAMICRODOSAGE DE LA GLYCEMIE

I. — *DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE*

A) *Principe.*

Le sang total prélevé sur le bout du doigt est déféqué par l'acide perchlorique. Après centrifugation, une partie aliquote du surnageant est mise à incuber avec une solution d'enzymes (glucose-oxydase + peroxydase) dans laquelle est incorporé le chromogène, l'ortho-dianisidine. On apprécie ensuite l'intensité de la coloration rose développée, après addition d'une solution d'acide sulfurique, au spectrophotomètre en comparaison avec celle développée à partir d'une solution standard de glucose.

B) *Réactifs.*

1. Solution standard de glucose : solution de 50 mg/1000 ml. Dissoudre le glucose dans une solution saturée d'acide benzoïque. Attendre au moins deux heures pour l'utiliser. Bonne conservation.

2. Acide perchlorique 0,33 N : 2,7 ml d'acide perchlorique à 70 p. 100 (d = 1,67) dans 100 ml d'eau distillée.

3. Acide sulfurique à 30 p. 100 : 30 ml d'acide sulfurique concentré (d = 1,83) pour 100 ml de solution.

4. Tampon Tris 0,1 M, pH = 7,5 : Dissoudre 24,3 g de Tris (hydroxy-amino-méthane) dans l'eau distillée. Compléter le volume à 1.000 ml. 50 ml de cette solution à 0,2 M seront amenés à pH = 7,5 avec l'aide chlorhydrique et portés au volume de 100 ml avec de l'eau distillée.

5. Solution à 0,5 M de phosphate dipotassique : 104,5 g de phosphate dipotassique pour 1000 ml.

6. Solution polyenzymatique * : dissoudre "chromogène 4" et "glucostat 4" dans un mélange composé de 100 ml d'eau distillée et de 100 ml de glycérine. Cette solution renferme la glucose-oxydase, la peroxydase et l'ortho-dianisidine. Elle est conservée à la température inférieure à —10°C, dans des flacons de verre foncé d'une contenance de 10 à 50 ml. Dans ces conditions, elle reste stable pendant 3 mois.

7. Réactif de dosage : au moment de l'emploi, on prépare ce réactif de la manière suivante : une partie de solution tampon tris (réactif 4) + une partie d'eau distillée + deux parties de solution polyenzymatique (réactif 6).

C) *Mode opératoire.*

1. — *Déprotéinisation :* Ajouter 20 microlitres de sang capillaire prélevé à l'aide d'une micropipette à l'extrémité du doigt, à 0,2 ml d'acide perchlorique (réactif 2). Rincer la pipette plusieurs fois en aspirant puis en refoulant la solution. Attendre cinq minutes. Ajouter 0,2 ml de solution de phosphate (réactif 5). Agiter soigneusement le mélange et centrifuger à 6.000 t/min. pendant cinq minutes.

2. — *Dosage colorimétrique :* Dans une série de tubes à hémolyse, ajouter les éléments mesurés en ml, ainsi qu'il suit :

Réactif	Analyse A	Témoin T	Glucose standard S
Réactif 7	1,0	1,0	1,0
Sang déféqué ..	0,1	—	—
Eau distillée	—	0,1	—
Glucose	—	—	0,1
Laisser trente minutes à la température de laboratoire ou vingt minutes à l'étude à 37°.			
Ac. sulfurique ..	1,0	1,0	1,0

Attendre cinq minutes puis lire au spectrophotomètre contre l'eau distillée à 520 mμ.

3. — *Calcul :* mg Glucose/100 ml $= \dfrac{E\,(A) - E\,(T)}{E\,(S) - E\,(T)} \cdot 105$

E = extinction observée dans les tubes.

D) *Discussions.*

1. — *Spectre d'absorption de la coloration développée :* La technique originale de Huggett et Nixon s'opère à pH neutre (7,5). La densité optique maximum se situe à la longueur d'ondes de 440 mμ. A pH acide obtenu par l'addition d'une solution à 30 p. 100 d'acide sulfurique, nous obtenons un spectre d'absorption représenté sur la figure n° 5. Nous remarquerons que le maximum d'absorption se trouve aux environs de 520 mμ.

---

* Glucose-oxydase de Worthington Biochemical Corporation ; la solution polyenzymatique est préparée à partir d'un mélange lyophilisé fourni par "Fab. de Prod. chimiques Schweizerhall", Bâle-Suisse.

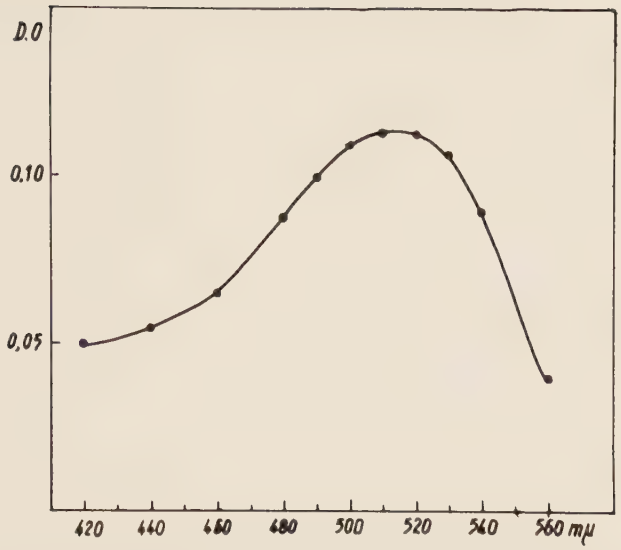


FIG. 5. — Spectre d'absorption de la coloration développée dans le dosage colorimétrique du glucose après attaque par la glucose-oxydase, la peroxydase et coloration avec l'o.dianisidine. (Graphispectral Jouan, trajet optique = 1 cm).

Il est intéressant de noter que l'utilisation d'une solution d'acide sulfurique à forte concentration permet non seulement d'interrompre le développement lent de la coloration (ce qui est le cas de la technique d'Huggett) rendant ainsi cette coloration plus stable, mais encore de l'intensifier minimisant ainsi les causes d'erreur.

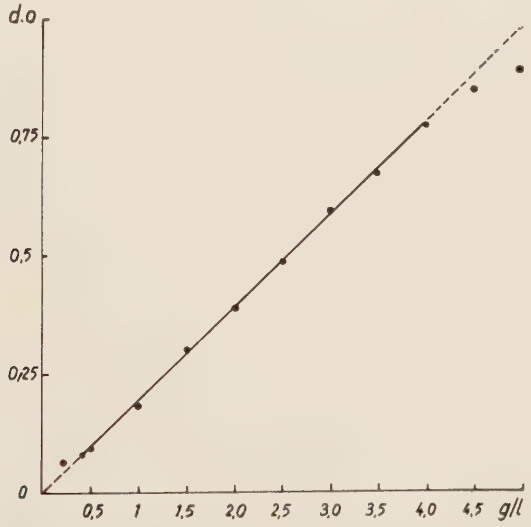


FIG. 6. — Proportionnalité entre la densité optique et la concentration en glucose. Lecture à 520 mμ.

2. — *Proportionnalité entre la densité optique et la concentration de glucose :* Ainsi que la courbe de la figure n° 6 le montre, il existe une proportionnalité satisfaisante entre la teneur en glucose et la densité optique relevée à 520 mμ pour les valeurs oscillant entre 0,4 g et 4,5 g de glucose par litre. Aussi, pour des concentrations en glucose supérieures à ce dernier chiffre, il faut opérer sur 0,05 ml de déféquat au lieu de 0,1 ml.

3. — *Améliorations par rapport à la méthode originale de Huggett :* En dehors de son caractère ultramicroanalytique cette technique assure une coloration stable, une fidélité satisfaisante.

La quantité d'enzyme utilisée est plus élevée que celle incorporée par Huggett, ce qui donne une oxydation complète du glucose pendant une courte durée d'incubation.

Le tampon tris inactive la maltase qui constitue souvent l'impureté de la glucose-oxydase.

II. — *RESULTATS*

Le dosage étant spécifique du glucose, les glycémies normales sont légèrement inférieures à celles déterminées par les méthodes chimiques.

Nous avons trouvé pour notre part, sur 600 déterminations chez les enfants non diabétiques, une valeur moyenne variant entre 0,70 g et 1,10 g par litre.

La figure n° 7 représente l'histogramme de la distribution où sont portées en abscisses les différentes valeurs de la glycémie et en ordonnées la fréquence observée.

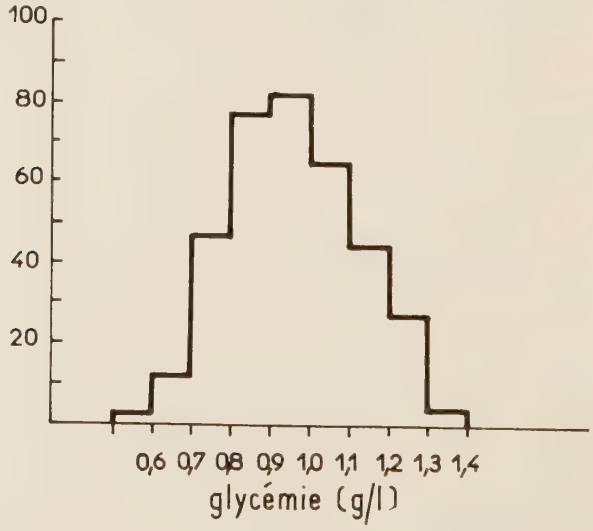


FIG. 7. — Histogramme de répartition des glycémies déterminées chez les enfants non diabétiques par la méthode à la glucose-oxydase.

Etude comparative des résultats
donnés par l'application de la méthode à la glucose-oxydase
et la technique chimique de Hagedorn et Jensen

La technique d'Hagedorn et Jensen appliquée au sang ayant subi la déprotéinisation cadmique comme l'a préconisé Dumazert est considérée comme étant la plus précise bien que délicate.

Nous avons effectué un certain nombre de déterminations de glycémie chez des enfants normaux et diabétiques. Pour cela, après piqûre à l'aide de l'aiguille de Franck de l'extrémité du doigt, nous prélevons 0,1 ml de sang en vue du dosage par la méthode chimique de 0,020 ml pour le dosage enzymatique.

Nous rapportons dans le tableau I les résultats de cette investigation. La figure n° 8 représente la courbe de corrélation entre les résultats obtenus par la technique de dosage chimique et les valeurs données par le dosage utilisant la glucose-oxydase.

Ces résultats montrent que les deux méthodes conduisent à des valeurs parfaitement comparatives. On doit noter cependant que les chiffres donnés par la méthode de Hagedorn et Jensen sont légèrement plus élevés que ceux fournis par celle utilisant l'enzyme.

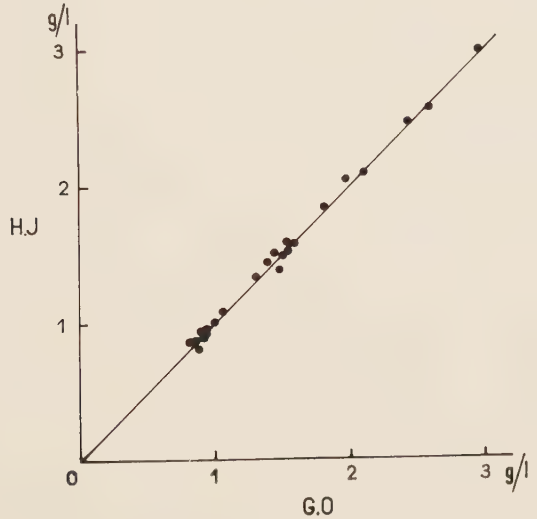


FIG. 8. — Courbe de corrélations entre les glycémies déterminées par la technique de Hagedorn et Jensen (H.J.) et celles déterminées par la méthode à la glucose-oxydase (G.O.).

TABLEAU I

Glycémies déterminées simultanément par la technique à la glucose-oxydase et par la méthode de Hagedorn et Jensen. Elles sont exprimées en g/litre de sang.

Echantillon	Glucose-oxydase (a)	Hagedorn-Jensen (b)	Ecart de (b) par rapport à (a)
	ENFANTS NORMAUX		
1	0,90	0,94	+ 4,4 p. 100
2	0,94	0,96	+ 2,1
3	0,89	0,91	+ 2,2
4	0,99	1,00	+ 1,0
5	0,81	0,88	+ 7,6
6	0 86	0,87	+ 1,1
7	0,93	0,93	0
8	1,05	1,08	+ 2,8
9	1,00	1,00	0
10	0,81	0,86	+ 6,1
	ENFANTS DIABETIQUES		
1	1,39	1,44	+ 3,5
2	1,30	1,33	+ 2,3
3	1,50	1,50	0
4	1,47	1,39	— 5,4
5	2,97	3,00	+ 1,2
6	2,10	2,10	0
7	2,60	2,58	— 0,8
8	1,91	1,95	+ 2,1
9	1,82	1,84	+ 1,7
10	1,52	1,60	+ 5,2

CHAPITRE II

EXPLORATION FONCTIONNELLE DU METABOLISME GLUCIDIQUE

La simple recherche d'une glycosurie et la mesure de la glycémie à jeûn fournissent les principales indications sur l'état de la régulation glycémique. Mais bien des épreuves fonctionnelles sont utiles pour tester les capacités réactionnelles et adaptives des systèmes régulateurs de la glycémie.

I. — *EPREUVE D'HYPERGLYCEMIE ALIMENTAIRE AU GLUCOSE*

A) *Principe et protocole.* — Il consiste à administrer per os une dose charge de glucose à un enfant à jeûn en état d'équilibre glucidique (régime normal et repas riche en glucides la veille au soir) et suivre les variations de la glycémie qui s'ensuivent.

La tolérance en glucose étant d'autant plus forte que l'enfant est plus jeune, on donne une dose proportionnellement élevée en glucose chez ce derniers.

La dose de glucose est de :

3 g/kg de 0 à 6 mois

2,5 g/kg de 6 mois à 1 an

2 g/kg de 1 an à 3 ans

1,75 g/kg de 3 ans à la puberté (maximum 50 g)

1 g/kg après puberté (maximum 50 g).

Le glucose sera dissous dans un verre d'eau de telle sorte que sa concentration ne dépasse pas 15 à 20 p. 100.

La glycémie prélevée sur sang capillaire après piqûre de l'extrémité du doigt à l'aide d'une aiguille de Franck, est dosée respectivement aux temps 0, 30, 60, 90, 120, 180 et 240 minutes. Les urines sont recueillies pendant la durée de l'épreuve et le glucose y est recherché et dosé s'il y a lieu.

B) *Résultats.* — Nous rapportons, dans le tableau II, quelques exemples d'hyperglycémie provoquée pratiquée dans ces conditions.

TABLEAU II

Résultats de quelques épreuves d'hyperglycémie provoquée par voie orale chez les enfants de 3 à 10 ans

Temps en minutes	GLYCEMIE (g/litre)				
	Malades n°				
	1	2	3	4	5
0	0,88	1,05	0,92	0,74	1,10
30	1,55	1,78	1,41	1,32	1,55
60	0,92	1,99	1,79	1,44	1,61
90	1,32	1,21	1,79	2,06	1,17
120	1,18	1,09	1,41	1,14	1,31
180	1,18	0,80	1,22	1,12	0,84
240	0,90	1,14	0,70	0,96	1,10

Quelle que soit la glycémie de départ, la courbe d'hyperglycémie provoquée revêt le type diabétique classique, c'est-à-dire qu'elle monte plus que normalement, de façon plus prolongée, et qu'elle revient à la normale dans un délai beaucoup plus long. La figure n° 9 en illustre un exemple.

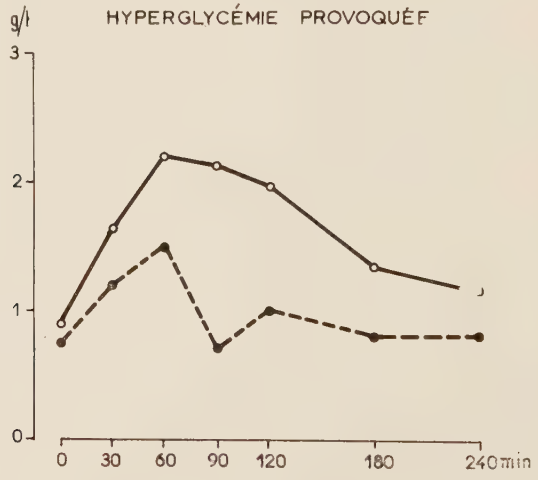


FIG. 9. — Epreuve d'hyperglycémie provoquée
En trait discontinu : réponse normale.
En trait plein : état prédiabétique.

Le type de courbe en trait plein représentée sur la figure n° 9 est caractéristique des états diabétiques et prédiabétiques, et lorsqu'on hésite entre la possibilité d'un diabète rénal glucosé et d'un diabète vrai, l'épreuve d'hyperglycémie provoquée tranche définitivement le diagnostic.

La courbe d'hyperglycémie provoquée peut revêtir plusieurs formes. Par exemple, on peut avoir une ascension brusque et assez importante de la glycémie au bout de 30 minutes, puis le retour accéléré de la glycémie à la normale avec souvent un triangle d'hypoglycémie secondaire (courbe 1 de la figure n° 10). Cette courbe est généralement interprétée comme l'indice d'une évacuation gastrique accélérée. Chez l'enfant, on la rencontre en particulier au cours des pancréatites, des fibroses kystiques du pancréas et au cours de certaines hypoglycémies (cas de ce malade).

Les courbes 2 et 3 de la figure 10 représentent deux états diabétiques : la première avec une flèche glycémique élevée (taux dépassant 0,90 g/litre la valeur de départ), le second par le retour tardif à la normale (240 min.).

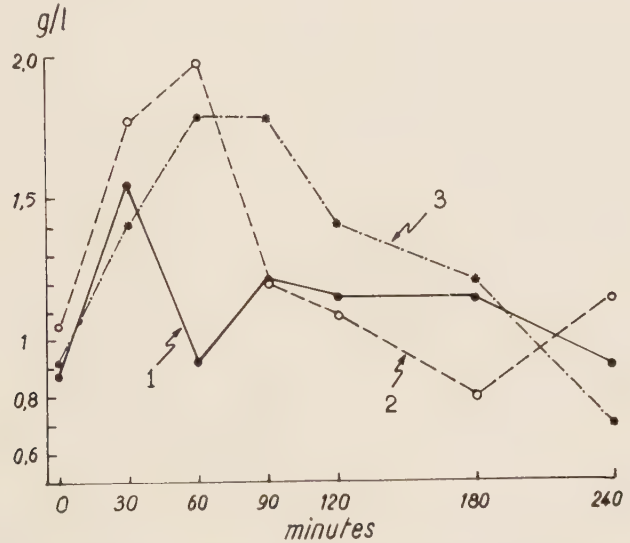


FIG. 10. — Exemples de courbes d'hyperglycémie provoquée chez l'enfant.

II. — *EPREUVE D'HYPERGLYCEMIE PROVOQUEE ADRENALINIQUE*

A) *Principe.* — Le pouvoir glycogénolytique de l'adrénaline est utilisé pour tester les stocks de glycogène hépatique et leur capacité de transformation en glucose sous l'action de cette hormone.

B) *Protocole opératoire.* — L'épreuve est effectuée après régime glucidique abondant les jours précédents et chez l'enfant

strictement à jeûn depuis la veille. L'adrénaline est injectée par voie intramusculaire profonde à la dose de 0,3 à 0,5 ml de la solution d'adrénaline à 1 p. 1000, en se méfiant d'un malaise ou d'un choc possible.

On mesure la glycémie successivement avant et 15, 30, 60 et 120 minutes après injection. Dans les urines recueillies avant l'injection puis à la fin de l'épreuve, on recherche et mesure grossièrement l'élimination des corps cétoniques.

C) *Résultats.* — Pratiquée chez une fillette atteinte de glycogénose hépatique, cette épreuve conduit à des résultats suivants :

Temps	*Glycémie* (g/l)
0	0,45
Après injection d'adrénaline	
15 min	0,50
30 min	0,55
60 min	0,60
120 min	0,52

On note, d'autre part, la présence des corps cétoniques dans les urines recueillies avant et après la charge.

Nous représentons, sur la figure n° 11, la courbe d'hyperglycémie provoquée par l'adrénaline. Normalement, quel que soit l'âge, la glycémie s'élève généralement de 0,30 à 0,50 g/litre en moins d'une demi-heure au-dessus du taux initial, puis revient à sa concentration initiale en une heure en moyenne. La courbe obtenue chez cette malade est plate. Elle montre que le glycogène hépatique n'est pas transformable en glucose sous l'influence de l'adrénaline.

III. — *EPREUVE D'HYPERGLYCEMIE PROVOQUEE AU GLUCAGON*

A) *Principe.* — Le glucagon est une hormone sécrétée par les cellules α des îlots de Langherans. Il possède le même pouvoir glycogénolytique que l'adrénaline et on lui attribue le même niveau d'action, à savoir une activation de la phosphorylase hépatique. Il exerce également une action sur l'utilisation cellulaire du glucose qu'il active de façon synergique à celle de l'insuline au contraire de l'adrénaline.

B) *Protocole.* — On injecte par voie veineuse ou intramusculaire un mg de glucagon par mètre carré de surface corporelle. Normalement l'opération est faite à jeûn, mais dans certains cas (glycogénoses avec déficit en amylo-1-6-phosphatase) il peut être intéressant de la répéter quelques heures après un repas riche en glucides.

On détermine la glycémie avant, puis respectivement 15, 30, 45 et 60 minutes après l'injection.

On recherche les corps cétoniques dans les urines recueillies avant et après l'épreuve.

C) *Résultats.* — Au cours de cette épreuve nous avons procédé à deux prélèvements sanguins sur lesquels nous avons dosé le glucose respectivement par la technique à la glucose-oxydase et par le procédé de Hagedorn et Jensen. Les résultats rapportés dans le tableau III montrent, malgré les chiffres légèrement supérieurs donnés par la seconde technique, la parfaite corrélation des deux techniques. Les courbes représentées sur la figure n° 11b objectivent ces résultats.

TABLEAU III

Epreuve d'hyperglycémie provoquée au glucagon

Temps après injection	GLYCEMIE (g/l)	
	Glucose-oxydase	Hagedorn - Jensen
0	0,53	0,56
15 min	0,45	0,49
30 min	0,43	0,42
45 min	0,40	0,50
60 min	0,41	0,45

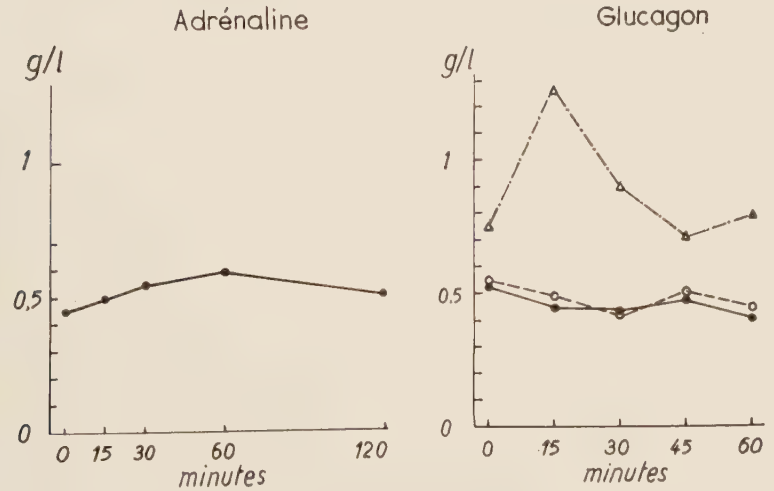


FIG. 11. — Epreuves d'hyperglycémie provoquée à l'adrénaline : à gauche (a) ; au glucagon : à droite (b)
Point blanc : dosage du glucose par la technique de Hagedorn-Jensen.
Point noir : glycémie par la glucose-oxydase.
Triangle : courbe normale.

Normalement, par la voie veineuse telle que nous avons utilisée, on obtient un maximum glycémique au bout de 15 minutes, de 0,50 à 0,75 g/ litre au-dessus du taux de départ. Le taux revient à la normale en 45 minutes en moyenne (courbe en point tiré sur la figure n° 11 b.

Dans notre cas, l'épreuve est considérée comme négative. En effet, la glycémie reste étale et même s'abaisse après injection de glucagon. Ce type de réponse est en faveur d'une glycogénose hépatique ou généralisée.

Nous avons noté que, comme dans l'épreuve d'hyperglycémie adrénalinique, les urines recueillies avant et après l'épreuve contiennent une quantité appréciable de corps cétogènes.

Malgré les résultats généralement parallèles entre le test à l'adrénaline et le test au glucagon, il existe certaines dissociations et il est nécessaire de coupler les deux explorations sans tendre à substituer l'une à l'autre. Les résultats du test au glucagon sont, semble-t-il, plus constants que ceux à l'adrénaline.

IV. — *EPREUVE DE GALACTOSEMIE PROVOQUEE*

A) *Par voie veineuse dans les glycogénoses.*

1) *Principe.* — Cette épreuve comporte des dosages de glucose, de galactose et d'acide lactique. Elle est essentiellement destinée à l'exploration des glycogénoses.

On sait qu'au niveau du foie, une série de réactions enzymatiques font passer le galactose à l'état de glucose-1-phosphate puis de glucose-6-phosphate. Le premier ester phosphorique concourt à l'élaboration du glycogène, tandis que le second, après hydrolyse par la glucose-6-phsophatase, fournit du glucose au sang.

Ainsi, l'ingestion ou l'injection du galactose n'est suivie d'hyperglycémie que si le passage du galactose au glucose-6-phosphate s'effectue normalement et si le glucose-6-phosphatase est présente.

Si celle-ci manque, la glycémie reste basse. De plus, l'apport du galactose ne conduisant qu'au glucose-6-phosphate (dont la seule voie de catabolisme est ici la voie cellulaire), la lactacidémie s'aggrave d'une façon importante.

Le protocole que nous suivons est celui préconisé par Schwartz (27).

2) *Mode opératoire.* — Le malade étant à jeûn, on pique le bout du doigt et on recueille 0,1 ml de sang pour le dosage des sucres réducteurs totaux, 0,02 ml pour le dosage du glucose par la glucose-oxydase et 0,1 ml pour celui de l'acide lactique.

On injecte ensuite par voie intraveineuse la dose de galactose (1 g/kg) en utilisant une solution à 30 p. 100 et en poussant très lentement.

Aussitôt après l'injection, on prélève 2 fois 0,1 ml (dosage des sucres réducteurs et de l'acide lactique) et une fois 0,02 ml de sang (dosage du glucose) et on recommence la même opération toutes les 10 minutes pendant une heure.

3) *Techniques analytiques :*

— dosage des sucres réducteurs totaux par la technique de Hagedorn et Jensen ;

— dosage du glucose vrai par la technique à la glucose-oxydase ;

— dosage de l'acide lactique : technique de Barker et Summerson (1). Après élimination des protéines par l'acide trichloracétique et du glucose par l'hydroxyde de cuivre formé *in situ*, l'acide du filtrat est transformé en acétaldéhyde ; celui-ci est dosé photométriquement grâce à la coloration qu'il donne avec le para-hydroxydiphényle.

Avec cette technique, on trouve normalement, chez l'adulte, des valeurs variant entre 80 et 150 mg/litre. Chez l'enfant, et particulièrement chez le nourrisson, les taux peuvent atteindre 200 à 500 mg/litre.

4) *Résultats.* — Pratiquée sur la même malade atteinte de glycogénose, cette technique nous a conduit aux résultats consignés dans le Tableau IV. Les courbes de la figure 12 nous permettent les variations de divers éléments dosés et d'en faire des commentaires.

TABLEAU IV

Exploration d'une glycogénose par l'épreuve de galactosémie provoquée par voie veineuse

Temps en minutes	Glycémie (a) g/l	Sucres réducteurs totaux (b) g/l	Galactose (b-a) g/l	Acide lactique g/l
à jeûn (6)	0,59	0,62	0,03	0,336
Injection du galactose et immédiatement				
après	0,73	1,84	1,10	0,384
10'	1,37	1,77	0,40	0,720
20'	1,27	1,57	0,30	1,200
30'	1,17	1,16	0	1,176
40'	0,76	0,80	0,04	1,296
50'	0,38	0,52	0,14	1,170
60'	0,38	0,49	0,11	1,200

5) *Discussion.* — Normalement, par la voie veineuse, la disparition du galactose est rapide, moins d'une heure (40 minutes en moyenne). La glycémie s'élève rapidement (dès la 10ème minute) et atteint le maximum dès la 20ème minute. Puis elle diminue progressivement. La flèche d'hyperglycémie oscille généralement entre 0,30 et 0,80 g/litre au-dessus du taux initial. De son côté, l'acide lactique varie peu. Partant d'un taux situé autour de 200 milligrammes, la lactacidémie baisse parfois par hémodilution ou augmente très peu.

En cas de carence en glucose-6-phosphatase (glycogénose du type I de Cori), la glycémie n'est pas modifiée par l'injection de galactose ; parfois même elle diminue. En revanche, l'acide lactique, dont les taux initiaux sont déjà élevés, va atteindre des taux considérables. Ce tableau est celui des carences totales en glucose-6-phosphatase dans leurs formes pures. Bien souvent, les réponses sont loin d'être aussi typiques.

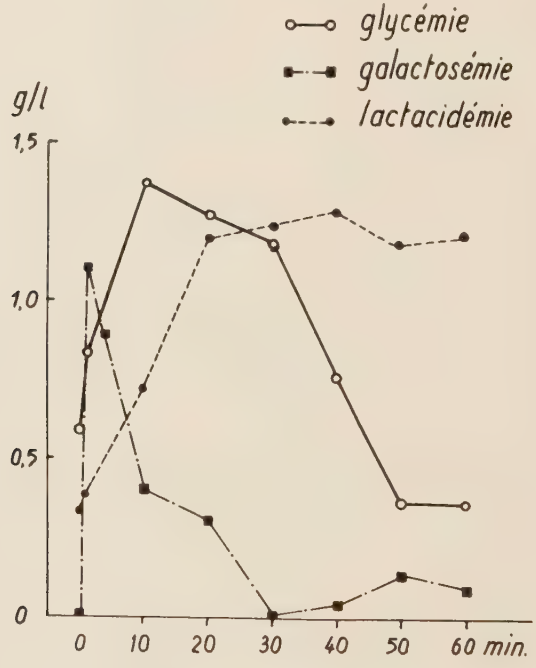


FIG. 12. — Epreuve de galactosémie provoquée par voie veineuse chez un enfant atteint de glycogénose.

En ce qui concerne notre cas, malgré une augmentation de la lactacidémie, la réponse de la glycémie et de la galactosémie semble exclure la forme avec déficit de glucose-6-phosphatase. Puisqu'il n'existe aucun blocage entre le galactose et le glucose,

on oriente l'hypothèse vers une carence en phosphorylase (type II de Cori) ou en amylo-1-6-glucosidase (type III de Cori) *.

B) *Par voie orale dans les galactosémies congénitales.*

Les moyens les plus spécifiques et les moins éprouvants d'exploration des galactosémies congénitales sont les dosages enzymatiques. Ils ne sont malheureusement pas à la portée d'un laboratoire non spécialisé. De même le dosage du galactose phosphate dans les globules est une opération délicate et longue.

Aussi, lorsque pose le diagnostic, on est en droit d'effectuer l'épreuve de galactosémie qui permettra, dans la plupart des cas, de déceler la carence en galacto-transférase.

1) *Principe.* — L'épreuve consiste à donner du galactose et à suivre sa transformation en glucose. Il faut noter que chez les sujets carencés en galactotransférase l'accumulation en galactose-1-phosphate peut provoquer une hypoglycémie grave. Aussi, l'épreuve doit être pratiquée avec une extrême prudence ; on se tiendra prêt à injecter du glucose aux moindres menaces de malaise.

2) *Mode opératoire.* — On effectue un prélèvement de 0,02 ml de sang, à jeûn pour doser le glucose vrai par le glucose-oxydase et un prélèvement de 0,1 ml pour doser les sucres réducteurs totaux par la technique de Hagedorn et Jensen.

On donne ensuite par la bouche une dose de l'ordre de 1 g/kg. On prélève ensuite toutes les demi-heures pendant deux heures, puis au bout de trois et de quatre heures. Chaque fois, un double dosage sera fait : glucose vrai et sucres réducteurs totaux.

3) *Résultats.* — Dans les cas normaux, la galactosémie s'élève dans les 30 minutes qui suivent la prise de galactose et revient à la normale en moins de deux heures. La flèche de galactosémie a lieu entre 30 et 60 minutes et ne dépasse pas 0,60 g/litre. Par ailleurs, la glycémie augmente de 0,10 à 0,60 g/litre.

* Les analyses anatomopathologiques et enzymatiques pratiquées sur les ponctions biopsies hépatiques et musculaires indiquent qu'il s'agit effectivement d'une glycogénose du type III.

La figure n° 13 illustre un cas normal.

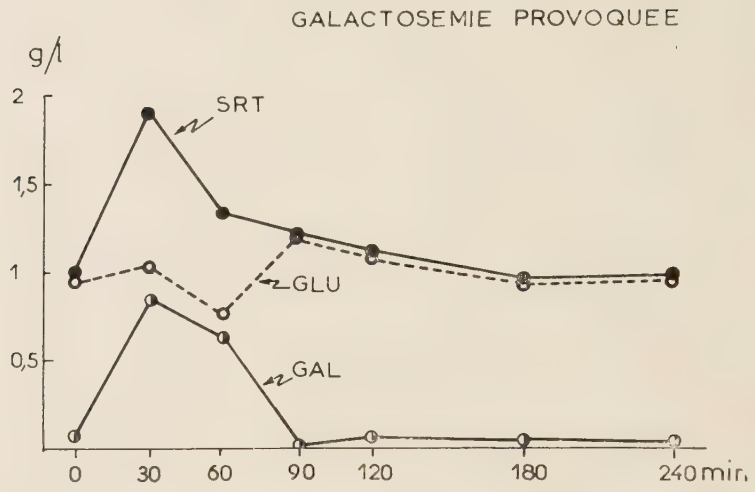


FIG. 13. — Epreuve de galactosémie provoquée par voie orale. Réponse normale.
SRT : sucres réducteurs totaux par la technique de Hagedorn et Jensen.
Glu : Glucose vrai par la glucose-oxydase.
Gal : Galactose obtenu par différence entre SRT et Glu.

(Nous avons vérifié, par chromatographie sur papier, que les sucres existant dans le sang après la charge du galactose sont constitués pratiquement par le galactose et le glucose).

Dans le cas d'une galactosémie congénitale, deux faits seront observés :

— la galactosémie atteint des taux élevés (0,80 à 1,50 g) et se prolonge très tardivement (4 heures et plus) ;

— la glycémie baisse régulièrement dès la première demi-heure et peut descendre à des taux suffisamment bas pour provoquer des accidents hypoglycémiques.

V. — *EPREUVE DE FRUCTOSEMIE PROVOQUEE*

1) *Principe.* — Cette épreuve consiste à donner du fructose par la bouche et à suivre sa transformation dans l'organisme grâce à un double dosage du glucose et du fructose. L'indication principale de cette épreuve est l'exploration des intolérances au fructose et des fructosuries essentielles.

2) *Mode opératoire.* — Dans la fructosurie essentielle, les doses sont habituellement de l'ordre de 2 g/kg chez le nourrisson, 1,75 g/kg chez le jeune enfant et moins de 1 g/kg avec le maximum de 50 g chez l'adulte.

Dans le cas d'une intolérance au fructose, il faut d'abord tester la susceptibilité de l'individu par des doses minimes (1 ou 2 g chez le nourrisson) afin d'éviter l'hypoglycémie qui peut être brutale et dramatique. Une seringue de sérum glucosé hypertonique doit être tenue prête.

Le problème des doses une fois réglée, l'épreuve de fructosémie provoquée se conduit de la manière suivante : on effectue les prélèvements de sang avant la charge du fructose puis 30, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes après. Chaque fois un double dosage sera pratiqué : celui du glucose (0,02 ml de sang) et celui du fructose (0,1 ml de sang).

3) *Techniques analytiques.*

a) glucose par la glucose-oxydase.

b) fructose : après déprotéinisation par le sulfate de zinc, le fructose est dosé par photométrie en appliquant la réaction de Selinvanof (technique de Roe modifiée par Cole, 10).

Voici les détails de cette technique :

Dans un tube à centrifuger, introduire successivement 2 ml de sulfate de zinc à 2,25 p. 100, 0,1 ml de sang et 2 ml de soude 0,1 N. Agiter soigneusement entre chaque addition. Porter au bain-marie bouillant pendant 3 minutes, refroidir et centrifuger à 6.000 t/min pendant cinq minutes.

La réaction colorée s'effectue de la manière suivante : dans un tube en verre mince (15×2 cm), introduire successivement 5 ml de réactif acide (*1*), 1 ml de solution de résorcine (*2*) et 2 ml de solution centrifugée. On prépare une gamme étalon contenant respectivement 20, 50, 150 et 200 microgrammes de fructose (*3*). On porte le tout au bain-marie bouillant pendant 12 minutes. Après refroidissement, on évalue l'intensité de la coloration développée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 480 mμ.

Pour chaque dosage il sera constitué un blanc contenant 2 ml d'eau à la place de la solution à doser.

(*1*) Réactif acide : glycérol bidistillé 130 g
HCl (d = 1,88) 100 ml
SO4Cu, 5 H20 42 g
Eau distillée 50 ml

(*2*) Solution aqueuse de résorcine à 0,45 g p. 100.

(*3*) Solution mère de fructose à 5 g p. 100 dans l'eau distillée saturée d'acide benzoïque.

Il est préférable de renouveler les réactifs tous les trois mois sauf la solution de résorcine qui doit être préparée au moment de l'emploi.

4) *Résultats.* — Dans les cas normaux (courbes de la figure 14), la charge en fructose est suivie d'une augmentation très variable de la glycémie. La fructosémie ne dépasse pas 0,10 à 0,15 g/l et disparaît en deux heures.

Mises à part les hépatites et les cirrhoses où s'observent des courbes de fructosémie anormales les épreuves d'hyperfructosémie provoquée sont demandées dans la fructosémie essentielle et l'intolérance au fructose : la fructosémie s'élève très haut après la charge et dure longtemps.

Dans le premier cas, la glycémie augmente peu ou pas ; dans le second, la glycémie s'effondre : par la glucose-oxydase on trouve des taux de l'ordre de 0,15 à 0,30 g/litre.

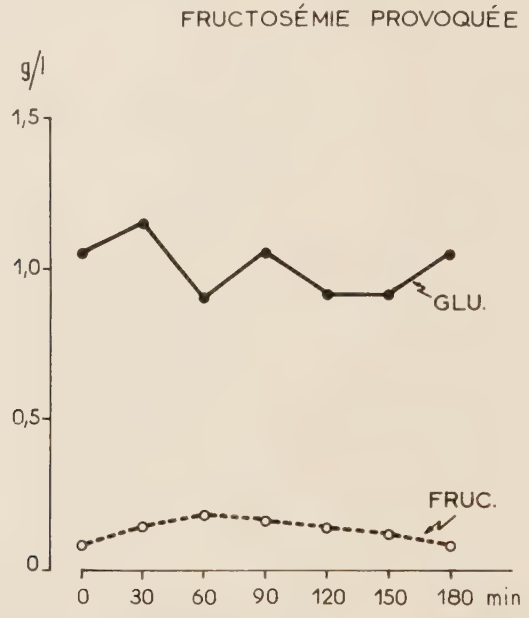


FIG. 14. — Exemple de courbes de fructosémie provoquée.
Cas normal.

Nous avons vu, au cours de ce chapitre, que les explorations fonctionnelles du métabolisme glucidique sont fréquentes, parce que fort utiles en Biologie infantile. Ces épreuves ont bénéficié grandement de la microméthode de dosage de la glycémie par le glucose-oxydase. Nous pensons que sans cette technique spécifique la mise en application pratique de bien des épreuves de glucidémie provoquée serait compromise.

CHAPITRE III

APPLICATION DE L'ULTRAMICRODOSAGE DE LA GLYCEMIE A L'ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DE CERTAINES DROGUES CHEZ L'ANIMAL

I. — *DETERMINATION DE LA GLYCEMIE*

A) *Chez le Lapin.* — Le prélèvement du sang se fait par la veine marginale de l'oreille de l'animal. Après nettoyage à l'éther sulfurique ou à l'alcool de la partie externe de l'oreille on fait passer, sur cette région, un tampon de coton imbibé de xylol afin de provoquer une vasodilatation. Par la pointe de l'aiguille intradermique, on fait une piqûre laissant sourdre une goutte de sang. On prélève 20 microlitres à l'aide d'une micropipette. Le reste du dosage se fait dans les conditions déjà décrites dans le premier chapitre.

Nous représentons, sur la figure 15, l'histogramme représentant les résultats des glycémies déterminées sur 34 animaux. On note que, par cette technique, les valeurs de la glycémie à jeûn chez le Lapin oscillent entre 0,80 et 1,10 g/litre.

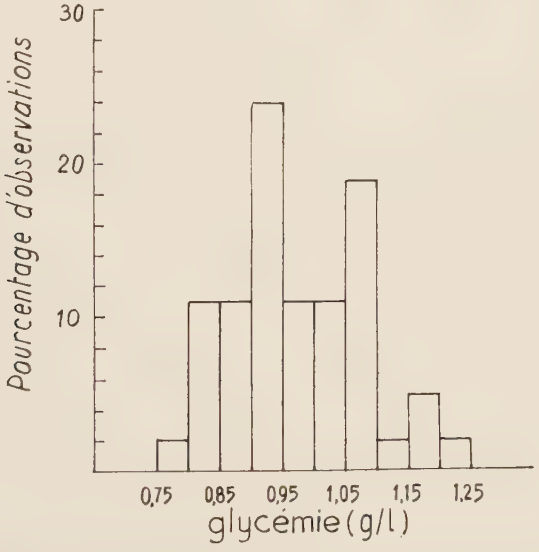


FIG. 15. — Glycémie à jeûn déterminée chez le Lapin "Fauve de Bourgogne".

B) *Chez le Rat.* — Le prélèvement du sang se fait par l'extrémité de la queue. A cet effet, après nettoyage à l'éther sulfurique qui déclenche une légère anesthésie locale, on sectionne, à l'aide des ciseaux, une rondelle de 2 mm environ du bout de la queue. On presse pour laisser sourdre une goutte de sang qu'on recueille à l'aide d'une micropipette de 20 microlitres. Après le prélèvement, on désinfecte la plaie puis on pratique l'hémostase en serrant fort avec une ficelle l'extrémité de la queue. Si l'on doit faire plusieurs prélèvements successifs, il suffit d'enlever la ficelle et presser sur la queue pour faire sourdre le sang.

Les résultats des glycémies déterminées sur 48 rats sont représentés sur la figure 16. On remarque que les valeurs normales chez le rat varient entre 0,60 et 1,00 g/litre.

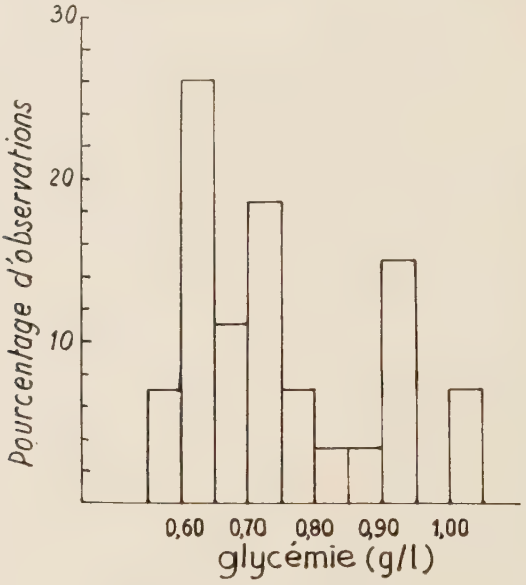
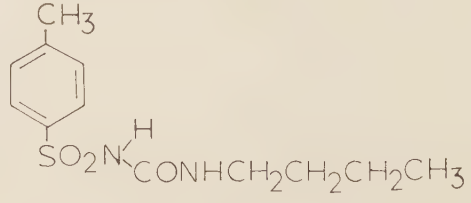


FIG. 16. — Glycémies à jeûn déterminées chez le Rat albinos.

II. — *ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DU TOLBUTAMIDE CHEZ LE LAPIN*

Le tolbutamide appartient au groupe des sulfamides hypoglycémiantes. Il répond à la formule :



Le tolbutamide

Son administration entraîne chez l'Homme, le Chien, le Lapin et le Rat une hypoglycémie dont l'intensité et la durée dépendent de la dose et de la voie d'administration.

Son action semble se traduire par une réduction de la néoglycogénèse, en une stimulation des cellules β des îlots de Langherans et en un freinage du débit glucosé hépatique.

Il est généralement choisi comme substance de référence dans l'étude de l'action hypoglycémiante des substances nouvelles.

Nous l'avons pris comme exemple de notre expérimentation chez le Lapin.

A) *Etude chez le Lapin après une hyperglycémie provoquée.* — Les animaux ne recevaient de nourriture pendant les 24 heures précédant les prises de sang. On détermine d'abord la glycémie à jeûn. Ensuite l'animal reçoit, par sonde œsophagienne, 1 g/kg de glycose en solution dans 10 ml d'eau.

Un lot de trois animaux sert de témoins et ne reçoit pas de tolbutamide.

Un autre lot reçoit, avant l'ingestion de glucose par sonde œsophagienne, 40 mg/kg de tolbutamide en suspension fine dans de l'eau distillée.

On suit les variations de la glycémie pendant 24 heures. Nous représentons sur la figure n° 17 les courbes de variations de la glycémie durant cette étude. On remarque chez les animaux témoins une élévation glycémique moyenne de 50 p. 100 au-dessus du taux initial. La glycémie redevient normale deux heures après l'ingestion de glucose déterminant ainsi un triangle hyperglycémique qui s'apparente à celui relevé chez l'Homme.

Chez les animaux ayant reçu au préalable le tolbutamide, l'élévation glycémique est peu importante (moyenne = 25 p. 100). Vient ensuite une vague hypoglycémique qui se maintient pendant longtemps, puisque la glycémie ne redevient normale qu'au bout de 24 heures.

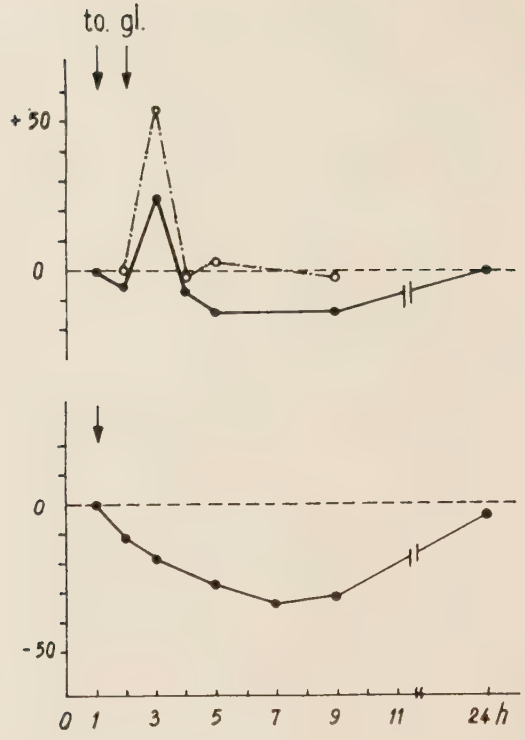


FIG. 17. — Action du tolbutamide sur la glycémie chez le Lapin.
En haut : après une hyperglycémie provoquée per os.
En bas : sur la glycémie chez l'animal à jeûn.
En ordonnée : variations par rapport à la glycémie initiale.

B) *Etude chez l'animal à jeûn.* — Les animaux avaient été privés de nourriture pendant 24 heures avant de recevoir la dose de 40 mg/kg de tolbutamide en suspension aqueuse, par sonde œsophagienne. Le contrôle de la glycémie à jeûn et les profils glycémiques de 24 heures après l'administration de la substance ont été effectués.

Les résultats sont rapportés dans le tableau V. Les profils glycémiques calculés en pourcentage de diminution par rapport à la glycémie initiale sont représentés sur la figure 17 (partie du bas).

TABLEAU V

Effet hypoglycémiant du tolbutamide chez le lapin à jeûn (moyenne sur trois animaux)

Temps en heures	Glycémie g/l	Variations — p. 100
0	1,08 ± 0,15	
1	0,97 0,16	11
2	0,88 0,16	18,5
4	0,78 0,12	27,8
6	0,71 0,09	34,2
8	0,74 0,11	31,5
22	1,03 0,04	4,6

L'action hypoglycémiante du tobultamide administré par voie orale au Lapin, perceptible deux heures après ingestion du produit atteint le maximum au bout de six heures et reste importante huit heures après.

III. — *ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DU CHLORPROPAMIDE CHEZ LE RAT*

Appartenant au même groupe de sulfamides hypoglycémiante que le tolbutamide, le chlorpropamide est le N_1 chloro-benzol-sulfonyl-N'-butylyrée. On remarque que dans la formule chimique du tolbutamide, le groupement méthyle en 4 est remplacé par le chlore.

Son action hypoglycémiante est sensiblement la même que possède le tolbutamide, avec une durée d'action plus longue. Il est utilisé souvent comme substance de référence au même titre que le tolbutamide, pour tester les substances nouvelles.

Nous avons pris comme exemple de description dans l'étude chez le Rat.

A) *Action du chlorpropamide sur le diabète alloxanique chez le Rat.* — Nous avons trouvé, après une série d'essais d'orientation, que l'alloxane Hoffman-Laroche en notre possession injecté rapidement par voie sous-cutanée au Rat est efficace à la dose de 80 mg/kg.

Un lot de six rats albinos d'un poids moyen de 300 g est utilisé pour cette expérience. Ils ont été privés de nourriture pendant trente-six heures avant le traitement par l'alloxane. Le diabète alloxanique s'installe au bout de quarante-huit heures avec hyperglycémie grave et amaigrissement.

Nous traitons ensuite les animaux par le chlorpropamide administré par sonde gastrique. Les doses sont adaptées en fonction de l'évolution de la glycémie.

Il est nécessaire, dans ces conditions, de pratiquer plusieurs prélèvements de sang en vue du dosage de la glycémie.

Les résultats sont représentés schématiquement par la figure n° 18. Ils montrent que face à un diabète aussi grave (glycémie atteignant 5 g/litre), le chlorpropamide s'est montré inefficace malgré cinq administrations de 120 mg à chaque fois.

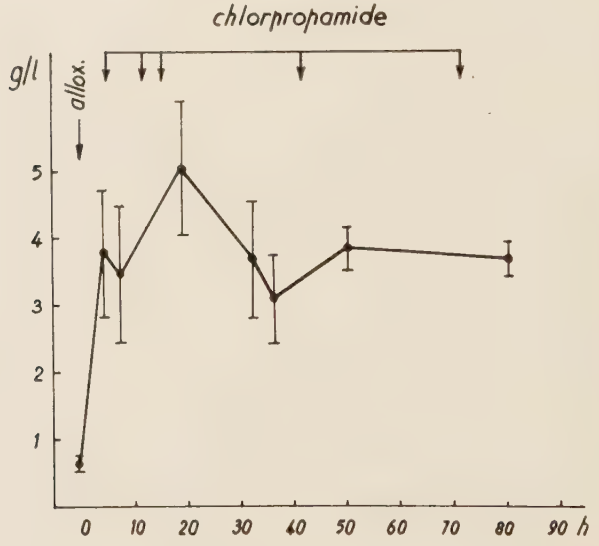


FIG. 18. — Action du chlorpropamide sur le diabète alloxanique chez le Rat.
allox. : alloxane par voie sous-cutanée.
chlorpropamide : 120 mg/kg par voie orale.

B) *Action du chlorpropamide sur le diabète provoqué par le diazoxide chez le Rat.* — Six rats d'un poids moyen de 250 g sont privés de nourriture vingt-quatre heures avant l'expérimentation. On administre le diazoxide par voie intrapéritonéale à raison de 250 mg/kg. Deux heures après l'injection du diazoxide, les animaux reçoivent 80 mg/kg de chlorpropamide par tubage gastrique.

Un groupe de six rats servant de témoins reçoit le diazoxide et n'est pas traité.

Les résultats sont groupés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Action du chlorpropamide sur la glycémie chez le Rat rendu diabétique par le diazoxide

Temps en heures	TEMOINS		CHLORPROPAMIDE	
	glycémie g/l	var p. 100	glycémie g/l	var p. 100
0	1,05 ± 0,10		0,91 ± 0,10	
0,10	diazoxide 200 mg/kg IP			
2	2,00 ± 0,32	+ 90,5	1,59 ± 0,28	+ 75
2,10			chlorpropamide	
4	2,10 ± 0,33	+ 100	0,92 ± 0,18	+ 1,5
6	1,10 ± 0,10	+ 4,7	0,67 ± 0,10	— 26,3
24	1,00 ± 0,09	— 4,7	0,76 ± 0,08	— 16,4

Les courbes de la figure 19 permettent d'apprécier l'influence du chlorpropamide sur l'hyperglycémie provoquée chez le Rat par le diazoxide.

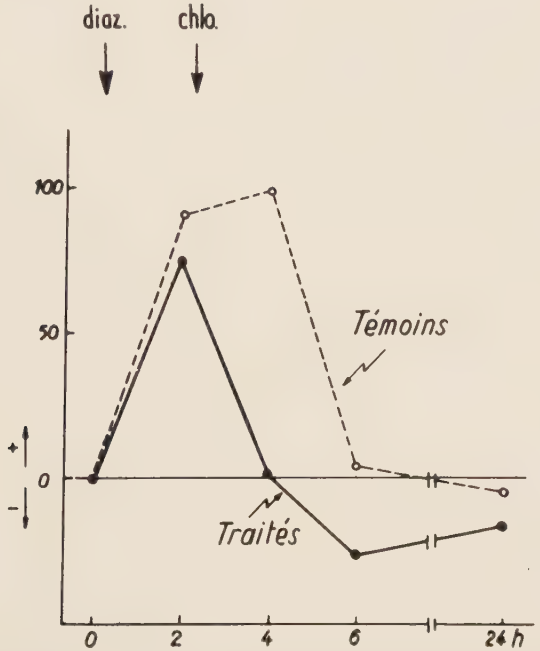


FIG. 19. — Influence du chlorpropamide sur l'hyperglycémie provoquee par le diazoxide chez le Rat.
En ordonnée : pourcentage en plus ou en moins par rapport à la glycémie initiale.

EXAMEN D'ENSEMBLE DES RÉSULTATS ET CONCLUSION

Nous avons vu au cours de l'analyse bibliographique que nos connaissances concernant les maladies du métabolisme glucidique ont progressé ces derniers temps d'une manière très rapide grâce à l'essor des nouvelles méthodes d'investigation. Celles-ci permettent, en effet, une identification beaucoup plus spécifique que dans le passé des entités chimiques apparaissant dans les humeurs, les tissus des sujets atteints d'une maladie métabolique.

Cependant, les techniques biochimiques utilisées sont trop souvent compliquées et constituent en général l'apanage des laboratoires spécialisés. Dans la pratique courante, les techniques simples telles que la détermination de la glycémie à jeûn et les épreuves d'hyperglucidémie provoquées restent les principales indications.

Bien souvent, les "erreurs innées" du métabolisme glucidique s'observent chez les nourrissons et chez les jeunes enfants. Dès lors le dosage de la glycémie, qui constitue l'élément de base de ces explorations, doit obéir à deux impératifs : exiger très peu de sang et doser spécifiquement le glucose.

Nous avons vu que de nombreuses microméthodes de dosage du glucose sanguin ont été proposées. Ce sont en réalité des dosages de corps réducteurs totaux et quoique le glucose y intervienne pour la plus grande partie, il est indispensable dans de nombreux cas de s'approcher le plus possible du glucose vrai.

Un premier effort fut accompli avec la technique de Hagedorn et Jensen avec la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium préconisée par Dumazert et celle de Somogyi-Nelson. Dans ces techniques une défécation raffinée cherchait à éliminer le maximum de substances réductrices non glucidiques.

Mais le véritable n'a été atteint qu'avec les méthodes utilisant la glucose-oxydase.

Dans ce domaine, les recherches doivent être dirigées vers le perfectionnement de la technique originale de Huggett et Nixon, à laquelle on reproche d'être peu sûre et peu sensible.

Cela justifie nos travaux qui avaient pour but de mettre au point le procédé d'ultramicrodosage (utilisant 20 microlitres) du glucose dans le sang, préconisé par Richterich et Colombo.

Cette étude nous a conduit aux résultats suivants :

— La coloration développée après attaque du glucose par la *glucose-oxydase* et réaction avec la peroxydase et l'ortho-dianisidine a son maximum d'absorption à 520 mμ.

— Pour des concentrations de glucose variant entre 0,40 g/l et 4 g/l, le coefficient d'extinction de la lumière est directement proportionnel à la quantité de glucose mise en œuvre.

— Déterminées sur 600 enfants non diabétiques, les valeurs de la glycémie se situent entre 0,70 g et 1,10 g par litre.

— Comparée à la méthode de Hagedorn et Jensen, reconnue comme étant la plus précise et la plus sûre des méthodes chimiques, cette technique donne des résultats très concordants.

Nous avons ensuite appliqué la technique à l'exploration du métabolisme glucidique en médecine infantile.

Plusieurs épreuves d'hyperglycémie alimentaire au glucose ont été pratiquées chez les enfants et chez les nourrissons. Nous en avons rapporté quelques exemples et discuté de leur signification physiologique.

Nous avons pratiqué également les épreuves de galactosémie provoquée et de fructosémie provoquée au cours desquelles nous avons pu souligner l'extrême utilité de la technique. D'une part, sa spécificité permet le dosage du glucose en présence du galactose et du fructose ; d'autre part, la faible quantité de sang demandée pour son application préserve aux enfants la torture des prélèvements multiples par voie veineuse au cours d'une même épreuve.

A l'occasion d'un glycogénose hépatique, nous avons pu grâce à cette technique, exécuter, dans un but d'orientation diagnostique, l'épreuve d'hyperglycémie provoquée au glucagon et à l'adrénaline et l'importante épreuve de galactosémie provoquée par voie intraveineuse avec détermination simultanée de la lactacidémie.

En ce qui concerne l'étude expérimentale du diabète et de l'action hypoglycémiante de certaines drogues, nous avons montré que l'ultramicrodosage de la glycémie nous rend d'immenses services. En effet, chez le Rat rendu diabétique par l'administration de l'alloxane ou du diazoxide, nous avons pu, par une simple et unique section de l'extrémité de la queue, déterminer une glycémie toutes les heures pendant douze heures afin de suivre son évolution sous l'influence du traitement par un hypoglycémiant.

Chez le Lapin, le diabète glucidique par charge orale de glucose a été étudié. Le sang, en vue du dosage de la glycémie a été prélevé par simple ponction de la veine marginale de l'oreille de l'animal.

Nous avons noté que la glycémie à jeûn normale chez le Rat se situe entre 0,60 g et 1,00 g par litre alors que chez le Lapin, elle se trouve entre 0,78 et 1,10 g par litre.

En résumé, grâce à de nombreux exemples, nous avons montré que l'ultramicrodosage de la glycémie par la glucose-oxydase, en raison de son caractère microanalytique et de sa spécificité, est très précieuse dans l'exploration fonctionnelle du métabolisme glucidique en Biologie clinique et en Biologie expérimentale.

LU et APPROUVE :
Le Président du Jury :
J.-C. DUMAZERT.

VU et APPROUVE :
Pour le Doyen,
L'Assesseur :
Ch. GREBUS.

VU et PERMIS D'IMPRIMER :
AIX-EN-PROVENCE, le 16 octobre 1967
Le Recteur : C. FRANK.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARKER (S.B.), SUMMERSON (W.H.). — *J. Biol. Chem.* 1941), *138*, 535.
2. BERNARD (Cl.). — *C.R. Acad. Sci.* (1876), *82*, 1389.
3. BEST (C.H.). — *Arch. Physio. Neerland.* (1919), *3*, 222.
4. BIERRY (H.), RANC (A.). — *C. R. Acad. Sci.* (1914), *158*, 278.
5. BIERRY (H.), RATHERY (F.). — Introduction à la physiologie des sucres. 1935. Baillères et Fils, Editeurs, Paris.
6. CARMINATI (G.M.). — *Experientia* (1964), 20 (11), 631.
7. CASTAIGNE, COMBIER, SCHULLER. — in Manuel d'analyses médicales et de biologie clinique, 1967, Editions Doin.
8. CECIL (R.), OGSTON (A.G.). — *Biochem. J.* (1948), *43*, 592.
9. CHAUVEAU (M.). — *C.R. Acad. Sci.* (1856), *42*, 1008.
10. COLE. — in Modern Methods of Plants analysis, tome II, p. 21 Springer-Verlag, Berlin, 1955.
11. COULTHARD (C.E.), MICHAELIS (R.), SKYES (G.), SKIMSHIRE (G.E.H.), STANFAST (A.F.B.), BIRKINSKAW (J.H.), RAISTRICK (H.). — *Biochem. (J.)* (1945), *39*, 24.
12. DUMAZERT (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1935), *17*, 1163.
13. DUMAZERT (C.), PENET (G.). — *C.R. Soc. Biol.* (1939), *130*, 558.
14. FOSTER (G.L.). — *J. Biol. Chem.* (1923), *55*, 291 et 303.
15. HIMSWORTH (H.P.). — *J. Physiol.* (1934), *81*, 29.
16. HUGGETT (A.S.G.), NIXON (D.A.). — *Lancet* (1957), *2*, 368.
17. HULTMAN (E.). — *Nature* (1959), *183*, 108.
18. KEILIN (D.), HARTREE (E.F.). — *Biochem. J.*, *42*, 230 (1948).
19. KEILIN (D.), HARTREE (E.F.). — *Biochem. J.* (1952), *50*, 331.
20. KESTON (A.S.). — Abstracts of papers 129 th Meeting ACS., p. 31C April 1956.
21. LOUBATIERES, ALRIC, MARIANI. — *C.R. Soc. Biol.* (1966), *160* (1) 168.
22. MERKLEN. — Les diabètes expérimentaux. Vigot Frères Editeurs, 1952.
23. MULLER (D.). — *Biochem. Zt.* (1928), *199*, 136.
24. RALPH (G.), ROEF. (R.J.), WILLIAM (R.W.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1964), *117* (2), 572.
25. RICHTERICH (R.), COLOMBO (J.P.). — *Klinische Wochenschrift* (1962), *40*, 1208.
26. SAIFER (A.), GERSTENFIELD (S.). — *J. Lab. Clin. Méd.* (1958), *51*, 448.
27. SCHWARTZ (V.), HOLZEL (A.), KOMROWER (G.M.). — *Lancet* (1958), *1*, 24.
28. SOMOGYI-NELSON, voir NELSON (N.). — *J. Biol. Chem.* (1944), *153*, 375.
29. SOMOGYI (M.). — *J. Biol. Chem.* (1929), *83*, 157.
30. TIEDMANN (F.), GMELIN (L.). — Die Verdaung nach Versuchen, 2 Ausg. Heidelberg and Leipzig Groos. 1831.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 21

LES GLUCIDES DANS LE SANG 23

I. — HISTORIQUE 23

II. — NATURE DES SUBSTANCES REDUCTRICES DANS LE SANG 23

III. — ROLE BIOLOGIQUE DES DIFFERENTES FRACTIONS DES GLUCINES SANGUINES 24
Catabolisme glucidique 25
Anabolisme glucidique 26
Sucre protéique 27
Sucre faiblement combiné 28

IV. — MALADIES DU METABOLISME AUTRE QUE LE DIABETE SUCRE 28
1. Fructosuries 28
2. Galactosémie 29
3. Pentosurie essentielle 29
4. Glycogénoses 29

PROBLEMES POSES PAR L'ETUDE BIOLOGIQUE DES MALADIES DU METABOLISME DES GLUCIDES 31

I. — DIABETE SUCRE 31
1. Glucémie à jeûn 31
2. Epreuve d'hyperglycémie provoquée par administration de glucose 33
3. Hyperglycémie provoquée par le glucagon 34
4. Hyperglycémie adrénalinique 34
5. Enregistrement continu de la glycémie 34

II. — DIABETES EXPERIMENTAUX ET ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DES DROGUES 35
Diabète alloxanique 36
Diabète par le diazoxide 37

III. — EXPLORATION FONCTIONNELLE DES AUTRES MALADIE DU METABOLISME 38

DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUCOSE 39

La glucose - oxydase 39

OBJET DU TRAVAIL 41

TRAVAUX PERSONNELS 43

Chapitre premier. — ULTRAMICRODOSAGE DE LA GLYCEMIE 43

I. — *DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE* 43
A. Principe 43
B. Réactifs 43
C. Mode opératoire 44
D. Discussions 44

Pages

II. — *RESULTATS* 46

Chapitre deuxième. — EXPLORATION FONCTIONNELLE DU METABOLISME GLUCIDIQUE 49

I. — *EPREUVE D'HYPERGLYCEMIE ALIMENTAIRE AU GLUCOSE* 49
A. Principe et protocole 49
B. Résultats 50

II. — *EPREUVE D'HYPERGLYCEMIE PROVOQUEE ADRENALINIQUE* 51
A. Principe 51
B. Protocole opératoire 51
C. Résultats 52

III. — *EPREUVE D'HYPERGLYCEMIE PROVOQUEE AU GLUCAGON* 52
A. Principe 52
B. Protocole 52
C. Résultats 53

IV. — *EPREUVE DE GALACTOSEMIE PROVOQUEE* 54
A. Par voie veineuse dans les glycogénoses 54
1. Principe 54
2. Mode opératoire 54
3. Techniques analytiques 55
4. Résultats 55
5. Discussion 56

B. Par voie orale dans les galactosémies congénitales 57
1. Principe 57
2. Mode opératoire 57
3. Résultats 57

V. — *EPREUVE DE FRUCTOSEMIE PROVOQUEE* 58
1. Principe 58
2. Mode opératoire 58
3. Techniques analytiques 59
4. Résultats 60

Chapitre troisième. — APPLICATIONS DE L'ULTRAMICRODOSAGE DE LA GLYCEMIE A L'ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DE CERTAINES DRGUES CHEZ L'ANIMAL 61

I. — *DETERMINATION DE LA GLYCEMIE* 61
A. Chez le Lapin 61
B. Chez le Rat 62

II. — *ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DU TOLBUTAMIDE CHEZ LE LAPIN* 62
A. Etude chez le Lapin après une hyperglycémie provoquée 63
B. Etude chez l'animal à jeûn 64

III. — *ETUDE DE L'ACTION HYPOGLYCEMIANTE DU CHLORPROPAMIDE CHEZ LE RAT* 65
A. Sur le diabète alloxanique chez le Rat 65
B. Sur le diabète provoqué par le diazoxide 66

EXAMEN D'ENSEMBLE des RESULTATS et CONCLUSIONS 69

BIBLIOGRAPHIE 73

TABLE DES MATIERES 75